

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. W. Klee

**Immunphänotypisierung und Charakterisierung der kolostralen
Alloantikörper von Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP)
transferierenden Kühen**

Inaugural-Dissertation
zu Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Aryan Homeira Assad
aus
Bonn
München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Klee

Korreferentin: Priv.- Doz. Dr. C. A. Deeg

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG.....	10
2 LITERATUR	12
2.1 Charakterisierung der Bovinen Neonatalen Panzytopenie	12
2.1.1 Klinik und Pathologie.....	12
2.1.2 Epidemiologie	13
2.2 Hypothesen zur Ätiologie und Pathogenese der BNP.....	14
2.2.1 Virale Infektion.....	14
2.2.2 Genetische Ursache	14
2.2.3 Toxische Ursache.....	15
2.2.4 Immunologischer Prozess	16
2.3 Kolostrum	17
2.3.1 Inhaltsstoffe	17
2.3.2 Bedeutung der Kolostrumversorgung.....	17
2.4 Immunglobuline	18
2.4.1 Verhältnisse der Immunglobuline im Kolostrum und Serum.....	18
2.4.2 Funktion der Immunglobuline	19
2.4.3 Anreicherung der Immunglobuline im Kolostrum.....	19
2.4.4 Absorption der Immunglobuline beim Kalb.....	20
2.5 Immuntoleranz.....	21
2.5.1 Autoantikörper und Autoimmunerkrankungen	22
2.5.2 Alloantikörper und Alloimmunerkrankungen.....	23
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Puffer und Lösungen	27
3.1.1 Puffer und Lösungen zur Lymphozytenpräparation.....	27
3.1.2 Puffer und Lösungen zur Aufbereitung der kolostralen Antikörper.....	27
3.1.3 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie	28
3.1.4 Färbelösungen.....	28
3.2 Probenmaterial	29
3.2.1 Kolostrum und Tiere	29
3.2.2 Direkte Konjugation der kolostralen Antikörper	30
3.3 Gewinnung von peripheren Blut-Leukozyten (PBL) und Thrombozyten..	31
3.3.1 Zählen der gewonnenen Leukozyten	32
3.3.2 Aufbereitung der PBL	32

3.4 Immunzytochemische Untersuchungen	33
3.4.1 Quantitative Analyse der Antikörperbindungen	33
3.4.2 Charakterisierung der kolostralen BNP transferierenden Antikörper.....	34
3.4.3 Bestimmung der Zielzellpopulation.....	35
3.5 Statistische Auswertung	37
4 ERGEBNISSE	38
4.1 Ermittlung der Konzentrationen von Kolostrum und sekundären Antikörpern	38
4.2 Identifikation der BNP transferierenden Antikörper im Kolostrum	40
4.3 Immunphänotypische Charakterisierung der BNP transferierenden Alloantikörper	43
4.3.1 Identifikation der alloreaktiven IgG-Subklasse	43
4.3.2 IgG1-Alloreaktivität an 70% der Leukozyten und 100% der Thrombozyten	45
4.4 Ermittlung einer altersabhängigen Veränderung der Zielantigen-expression	46
4.4.1 Das BNP-Zielantigen bleibt bei der Zellreifung stabil exprimiert	47
4.5 Identifikation und Phänotypisierung der Zielzellen	48
4.5.1 Nur wenig Alloreaktivität der BNP-IgG1-Antikörper an bovinen Blutzellen der lymphoiden Zellreihe	49
4.5.2 BNP-IgG1-Alloantikörper binden an 100% der Zellen aus der myeloiden Zellreihe	51
5 DISKUSSION	55
6 ZUSAMMENFASSUNG	73
7 SUMMARY	75
8 LITERATURVERZEICHNIS	76
DANKSAGUNG	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMIR	engl.: antibody mediated immune response; Antikörpervermittelte Immunantwort
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BNP	Bovine Neonatale Panzytopenie
bov.	bovin
bspw.	Beispielsweise
BT	Bluetongue Disease
BV	Braunvieh
BVD	Bovine Virus Diarrhoe
CD	engl.: Cluster of differentiation; Erkennungsmolekül an der Oberfläche von Zellen
CMIR	engl.: cell mediated immune response; Zellvermittelte Immunantwort
DAB	Diaminbenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting; Durchfusszytometrie
FAIT	Fetale Alloimmune Thrombozytopenie
FcRn	Neonataler Fc- Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FV	Fleckvieh
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Holstein-Friesian
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNA	engl.: human neutrophil antigen; Humanes Neutrophilenantigen
HPA	engl.: human platelet antigen; Humanes Thrombozytenantigen

Abkürzungsverzeichnis

IFN γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL	Interleukin
KMP	Kardiomyopathie
KS-Test	Kolmogorov-Smirnov Test
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lsg.	Lösung
m	männlich
MFI	engl.: mean fluorescent intensity; mittlere Fluoreszenzintensität
MDBK- Zellen	Mabin-Darby bovine kidney cells
MHC-I, MHC-II	engl.: major histocompatibility complex-I;- II; Haupthistokompatibilitätskomplex- Klasse-I und II
min.	Minute
MW-Test	Mann-Whitney-Test
Nab	Natürliche Antikörper
NAIT	Neonatale Alloimmune Leukozytopenie
p	Signifikanz
PBL	Periphere Blutleukozyten
PCV2	Porcines Circovirus Typ2
PBS	engl.: Phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Kochsalzlösung
POD	Peroxidase
prim.	primär
PVP-T	Polyvinylpyrrolidon-Tween
rcf	engl.: Relative centrifugal force; relative Zentrifugalkraft
RT	Raumtemperatur
SB	Schwarzbunt
sek.	sekundär
Tab.	Tabelle

Abkürzungsverzeichnis

Th-1	T-Helferzelle 1
Th-2	T-Helferzelle 2
TNF	Tumornekrosefaktor
TRALI	Transfusion Related Acute Lung Injury
w	weiblich

1 EINLEITUNG

Bei der bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP), die auch als „Hämorrhagische Diathese“ oder „Kälberbluten“ bekannt ist, handelt es sich um eine in Europa seit 2007 auftretende Krankheit bei neugeborenen Kälbern (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009). Betroffen sind vor allem Kälber im Alter von ein bis drei Wochen ohne nennenswerten Unterschied in der Rassen- sowie Geschlechtsverteilung (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009; Sanchez-Miguel et al., 2010). Die Krankheit zeichnet sich durch eine hohe Anfälligkeit zur Blutungsneigung mit einer schwerwiegenden Knochenmarksschädigung aus und führt meist zum Tode. Initial weist der Blutbefund eine Leukozytopenie und Thrombozytopenie auf, gefolgt von einer Blutungsanämie (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009; Kappe et al., 2010).

Bisherige Untersuchungen zum Krankheitsgeschehen lieferten keine konkreten Hinweise auf eine toxische oder rein hereditäre Ursache (Kappe et al., 2010; Ballingall et al., 2011; Krappmann et al., 2011). Infektiöse Ursachen wurden bislang auch nicht nachgewiesen (Friedrich et al., 2009; Bell et al., 2010; Kappe et al., 2010; Willoughby et al., 2010).

BNP kann jedoch über die Aufnahme von Kolostrum transferiert werden, woraufhin ein Zusammenhang der Entstehung mit maternalen Alloantikörpern diskutiert wurde (Friedrich et al., 2011; Schroter et al. 2011). Zudem wurde kürzlich in Seren von BNP-Überträgerkühen die Anwesenheit und Bindung von Alloantikörpern an Leukozyten gesunder Kälber nachgewiesen (Pardon et al., 2010; Bridger et al., 2011). Obwohl aber das Kolostrum eine primäre Rolle bei der Entstehung von BNP spielt, existierten bislang keine Untersuchungen auf immunologischer Basis.

Des Weiteren fallen die an BNP erkrankten Kälber in den Sektionsberichten durch hämorrhagische Blutungen mit einer Knochenmarksschädigung auf (Friedrich et al., 2009; Kappe et al., 2010). Demzufolge ist neben dem Blut auch das Knochenmark Zielorgan für die BNP transferierenden Antikörper. Obwohl deutlich wird, dass nicht nur das Blut, sondern auch das Knochenmark eine zentrale Rolle bei der BNP spielen, sind insbesondere die pathogenetisch assoziierten Mechanismen auf Blutzellebene noch weitgehend unklar. Um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu erlangen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Alloreaktivität der Antikörper gegenüber peripheren Blutzellen untersucht.

Ein weiteres Ziel dieser Studie bestand außerdem in der immunphänotypischen Charakterisierung der BNP transferierenden Alloantikörper im Kolostrum. Die Identifizierung der Subklasse jener verantwortlichen Antikörper sollte einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der beteiligten Pathomechanismen liefern.

2 LITERATUR

2.1 Charakterisierung der Bovinen Neonatalen Panzytopenie

2.1.1 Klinik und Pathologie

Das klinische Bild der BNP ist charakterisiert durch eine erhöhte Blutungsneigung, die meist von außen durch unstillbares Nachbluten nach Injektionen, Enthornungen oder Insektenstichen erkenntlich wird (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009). Die Kälber werden zunächst durch Trinkschwäche, Störung des Allgemeinbefindens sowie oft mit BNP einhergehenden sekundären Infektionen wie etwa Nabel- oder Lungenentzündungen und Durchfallerkrankungen auffällig. Des Weiteren kann blutiger Kot verschiedenen Ausmaßes beobachtet werden, sowie blasse Schleimhäute und Petechien, bis hin zu Ekchymosen oder gar Hämatomen (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009). Viele Kälber leiden auch unter Fieber ohne identifizierbare Ursache. Das Blutbild der betroffenen Kälber weist initial eine hochgradige Leukozytopenie und Thrombozytopenie auf, im späteren Verlauf eine Anämie, die auf die unstillbaren Blutungen zurückzuführen ist (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009).

Die Letalität der Erkrankung liegt bei ca. 95% der vorgestellten Patienten (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009). Die betroffenen Kälber sind im Durchschnitt zwei Wochen alt, was jedoch keine genauen Rückschlüsse auf die Initialphase der Erkrankung zulässt, da die Patienten oftmals erst in der Finalphase der BNP mit auffälligem Allgemeinbefinden und infauster Prognose vorgestellt werden (Friedrich et al., 2009). Bei der pathologischen Untersuchung wurden massive innere Blutungen an allen Organen festgestellt (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009; Kappe et al., 2010). Histopathologische Untersuchungen ergaben Panmyelophthase in Femur und Sternum, in denen vor allem die Megakaryozyten, die Vorläuferzellen der Thrombozyten, dezimiert waren (Friedrich et al., 2009). Darüber hinaus waren Leber und Milz histopathologisch unauffällig, und es konnten keine Hinweise auf eine Vaskulopathie gefunden werden. Der Nachweis von BVD- und Blauzungen-Virus verlief ebenfalls stets negativ (Bell et al., 2010; Kappe et al., 2010).

2.1.2 Epidemiologie

Seit 2007 wird das Auftreten der BNP in Deutschland mit rasch steigender Inzidenz beschrieben (Friedrich et al.,2009). Kurz darauf wurde auch über die Häufung von BNP-Fällen in Holland (Smolenaars A and Mars M,2009), Belgien (Pardon et al., 2009), Großbritannien (Bell et al.,2010) und Frankreich (Corbière et al.,2009) berichtet. Die Schweiz und Österreich waren bislang frei von BNP (Friedrich et al.,2009). BNP tritt bei Kälbern verschiedener Rassen und Betrieben auf, sowie bei Kälbern in aufeinander folgenden Laktationen der Mutterkuh (Friedrich et al.,2009).

Im Jahr 2009 wurde eine Häufung der vorgestellten Patienten in den Sommermonaten beobachtet, was zunächst auf ein saisonal bedingtes Auftreten hindeutete (Friedrich et al.,2009). Diese Vermutung konnte im weiteren Verlauf der epidemiologischen Untersuchungen bald ausgeschlossen werden, nachdem auch in den kälteren Monaten gehäuft Kälber mit BNP gemeldet wurden (Friedrich et al.,2009).

Darüber hinaus ergaben epidemiologische Studien eine Gemeinsamkeit hinsichtlich der BVD-Impfung in den betroffenen Betrieben, bei denen derselbe inaktivierte Impfstoff eingesetzt wurde (Friedrich et al.,2009; Pardon et al.,2009). Schon frühzeitig resultierte daraus der Verdacht eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen BNP und diesem Impfstoff. Des Weiteren führten Bastian et al. (2011) Experimente durch, bei denen Seren von BVD-geimpften BNP-Überträgerkühen auf die Anwesenheit von alloreaktiven Antikörpern gegen bovine Leukozyten getestet wurden. Im Vergleich zu Seren von BVD-ungeimpften Kühen sowie von Kühen, die mit anderen BVD-Impfstoffen geimpft wurden, konnten signifikant mehr Bindungen von Alloantikörpern aus BNP-Seren detektiert werden. Darüber hinaus ergab die direkte Impfung von Meerschweinchen und Kälbern mit dem entsprechenden Impfstoff eine Immunisierung mit alloreaktiven Antikörpern, die gegen Oberflächenantigene von bovinen Leukozyten gerichtet waren und daraus resultierend die Hypothese eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Erkrankung und dem Impfstoff (Bastian et al.,2011).

2.2 Hypothesen zur Ätiologie und Pathogenese der BNP

2.2.1 Virale Infektion

Die Häufung von BNP-Fällen und die ersten Fälle von Blauzungkrankheit (Bluetongue disease, BT) traten in etwa zur gleichen Zeit auf (Friedrich et al.,2009; Pardon et al.,2009). Diese zeitliche Korrelation zwischen BNP und BT deutete auf eine mögliche kausale Verbindung hin. Allerdings brachte die histopathologische sowie serologische Untersuchung aller betroffenen Kälber auf das Bluetongue-Virus keine positiven Ergebnisse (Friedrich et al.,2009; Pardon et al.,2009).

Da sich das hämorrhagische Syndrom einer BVD-Infektion mit dem BVD Virus Typ 2 klinisch ähnlich äußert wie die BNP (Doll and Moenning,2002), wurde eine Infektion mit BVD2 ebenfalls diskutiert. Die BVD-Infektion geht jedoch mit einer peripher bedingten Thrombozytopenie (Hamers et al.,2000) und nicht, wie bei der BNP, mit einer Schädigung der Vorläuferzellen im Knochenmark einher, und ließ somit einen kausalen Zusammenhang ausschließen. Des Weiteren lieferten PCR- sowie ELISA-Untersuchungen auf das BVD Virus-Antigen bei allen betroffenen Kälbern negative Ergebnisse (Friedrich et al.,2009; Pardon et al.,2009; Bell et al.,2010; Kappe et al.,2010).

Kappe et al. (2010) postulierten einen kausalen Zusammenhang zwischen BNP und einer Infektion mit dem Porcinen Circovirus Typ 2 (PCV2), da sie in ihren Untersuchungen die DNA des PCV2 bei fünf von 25 BNP-Kälbern sowie bei einem von acht Kontrolltieren nachweisen konnten. Weitere Untersuchungen auf eine mögliche Beteiligung des PCV2-Virus bei 94 betroffenen Kälbern lieferten negative Befunde und konnten somit die Hypothese einer PCV2-Infektion nicht bestätigen (Willoughby et al.,2010).

2.2.2 Genetische Ursache

Beim Rind sind zwei genetisch bedingte Gerinnungsstörungen bekannt, an denen hauptsächlich die Gerinnungsfaktoren VIII (Khalaj et al.,2009) und XI (F11) (Marron et al.,2004) beteiligt sind und beim japanischem Braunvieh (Khalaj et al.,2009) sowie beim Holstein-Friesian (HF) mehrfach beschrieben wurden (Kociba et al.,1969; Brush et al.,1987; Gentry et al.,1997). Für die Gerinnungsstörung des F11 ist eine Genmutation im Exon 12 verantwortlich (Marron et al.,2004). Da in einem Betrieb mit

vornehmlich reinrassigen Holstein-Friesians (HF) sowie Charolais-Holstein-Kreuzungen in kurzer Zeit neun Kälber an BNP erkrankt waren, wurde deren Verwandtschaft zueinander und die Gensequenz des Gerinnungsfaktors XI (F11) auf eine mögliche Mutation untersucht (Krappmann et al.,2011). Im Folgenden wurde bewiesen, dass die an BNP erkrankten Kälber von demselben Charolais-Holstein Zuchtbullen abstammten, was auf einen hereditären Zusammenhang mit der BNP hindeutet (Krappmann et al.,2011). Die Gensequenzierung des F11 der betroffenen Kälber auf eine mögliche Mutation im Exon 12 brachte unterdessen keine positiven Ergebnisse und schließt demzufolge einen Gendefekt des Gerinnungsfaktors XI als Ursache für BNP aus (Krappmann et al.,2011).

Ferner untersuchten Ballingall et al. (2011) eine Verbindung zwischen der genetischen Vielfalt des MHC-II-Moleküls bei Kälbern (Robinson et al.,2010) und der Anfälligkeit, an BNP zu erkranken. Die Analyse der Allelfrequenzen des MHC-II-Moleküls zwischen 43 erkrankten und 68 gesunden Holstein-Friesian Kälbern ergab allerdings keinen Unterschied und folglich keinen Hinweis auf eine Assoziation zwischen BNP und der genetischen Variation des MHC-II-Moleküls (Ballingall et al.,2011).

2.2.3 Toxische Ursache

Bei Rindern sind mehrere Toxine und Arzneimittel bekannt, die eine hämorrhagische Diathese verursachen können (Stöber,2006).

In den frühen 70er Jahren wurden Petechien bei Kälbern beobachtet, nachdem ihnen täglich sechs Wochen lang 8,5mg/kg Furazolidon verabreicht wurde (Hofmann,1972). Aufgrund des langen Zeitraumes bis zur Erkrankung und der negativen Befunde von stichprobenweise selektierten BNP-Kälbern auf Furazolidon, wurde die Beteiligung dieses Toxins an BNP ausgeschlossen (Kappe et al.,2010). Die Untersuchungen auf eine Überdosierung von Chloramphenicol und Sulfonamiden, die zu einer aplastischen Anämie aufgrund einer Knochenmarksschädigung führen (Ammann et al., 1996; Young, 2005), ergaben ebenso negative Resultate (Kappe et al.,2010).

Darüber hinaus wurden BNP-Kälber stichprobenweise auf weitere für das Knochenmark toxische Substanzen wie Trichloräthylen, welches bei der Extraktion für Sojaschrot verwendet wird, sowie Adlerfarn und Makrozyklische Trichothezene

(Stöber,2006) getestet und konnten gleichermaßen keine Hinweise auf toxische Ursachen liefern (Kappe et al.,2010).

2.2.4 Immunologischer Prozess

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin sind Alloimmunerkrankungen beschrieben. Die fetale oder neonatale Thrombozytopenie (FAIT/NAIT) beim Menschen ist wie die BNP durch einen Abfall der Thrombozyten sowie Leukozyten mit einer daraus resultierenden hämorrhagischen Diathese beim Neugeborenen charakterisiert (Gramatges et al.,2009). Bei neugeborenen Ferkeln spielt sich bei der neonatalen alloimmunen Thrombozytopenie eine ähnliche Pathogenese unmittelbar nach der Geburt und mit Aufnahme des Kolostrums ab (Forster,2007). Diesen Immunerkrankungen liegt eine Bildung maternaler Antikörper, gegen Thrombozytenantigene des Ferkels oder gegen das humane Thrombozytenantigen (HPA) des menschlichen Fetus zu Grunde (Forster,2007; Gramatges et al.,2009).

Basierend auf diesen Kenntnissen und der Beobachtung der Landwirte, dass die betroffenen Kälber Kolostrum bestimmter Mutterkühe aufnehmen müssen, um zu erkranken, fokussierten Friedrich et al. (2011) ihre Untersuchungen auf eine denkbare Verbindung zwischen der Aufnahme von Kolostrum und dem Auftreten von BNP. In dieser Studie erhielten sechs neugeborene Kälber, die von bislang unauffälligen Kühen stammten, aufgetautes Kolostrum von Kühen, die zuvor mindestens ein Kalb geboren hatten, das wenig später an BNP erkrankt war. Die hämatologische Untersuchung wies bei drei von sechs Kälbern bereits wenige Stunden nach der Kolostrumaufnahme massive Thrombozytopenien und Leukozytopenien auf, woraufhin sie im weiteren Verlauf an BNP erkrankten (Friedrich et al.,2011). Der Verdacht, dass Kolostrum und die darin befindlichen Antikörper für die Entstehung von BNP eine entscheidende Rolle spielen, wurde zusätzlich bekräftigt, in dem Seren von BNP-Überträgerkühen auf die Anwesenheit und Bindungsfähigkeit von Alloantikörpern an gesunden Kälberleukozyten getestet wurden (Pardon et al.,2010; Bridger et al.,2011). Bei allen BNP-Seren konnten im Vergleich zu den Kontroll-Seren signifikant höhere Antikörpertiter gemessen werden (Bridger et al.,2011). Darüber hinaus wurden Antikörperbindungen an Leukozyten detektiert, was ebenfalls in der Kontrollgruppe nicht beobachtet wurde (Pardon et

al.,2010; Bridger et al.,2011). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Kälberleukozyten ein oder mehrere Zielantigene für die maternalen Alloantikörper exprimieren (Pardon et al.,2010; Bridger et al.,2011).

Erst kürzlich wurde die Bindung von maternalen Alloantikörpern an MHC-I-Molekülen von bovinen Leukozyten und MDBK-Zellen (Madin-Darby bovine kidney cells) nachgewiesen, woraufhin MHC-I als einer der möglichen Kandidaten für das entsprechende Zielantigen gegenwärtig diskutiert wird (Deutskens et al.,2011; Foucras et al.,2011).

2.3 Kolostrum

2.3.1 Inhaltsstoffe

Das Kolostrum besteht aus Sekreten der Milchdrüse sowie Bestandteilen aus dem Blut, wie den Immunglobulinen und anderen Proteinen, und sammelt sich während der letzten vier Trächtigkeitswochen in der Milchdrüse an (Foley and Otterby,1978). Etwa eine Woche vor der Kalbung wird das eiweiß- und immunglobulinreiche Sekret durch die einsetzende Synthese von Lactose mit Wasser verdünnt und bildet das Erstkolostrum, das nach der Kalbung abgegeben wird (Foley and Otterby,1978).

Im Hinblick auf die Zusammensetzung unterscheidet sich das Kolostrum deutlich von der reifen Milch. Vor allem das Erstkolostrum fällt durch seine gelbe Farbe und die höhere Viskosität auf.

Neben einem höheren Gehalt an Trockenmasse, Fett, Casein, Enzymen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Mineralstoffen und Vitaminen zeichnet sich das Erstkolostrum primär durch seinen hohen Immunglobulingehalt aus (Foley and Otterby,1978). Bereits nach dem ersten Gemelk nehmen die Konzentrationen aller Bestandteile stark ab und entsprechen zum Ende der Kolostralphase denen der reifen Milch. Lediglich der Gehalt an Lactose steigt während dieser Zeit an und ist in der Milch höher als im Kolostrum (Foley and Otterby,1978; Levieux and Ollier,1999).

2.3.2 Bedeutung der Kolostrumversorgung

Das Immunsystem der neugeborenen Kälber ist bis einige Wochen nach der Geburt noch nicht eigenständig belastbar (Morein et al.,2007). Dieser Zustand ist auf die

Plazenta epitheliochorialis der Rinder (auch bei Pferden, Ziegen und Schweinen) zurückzuführen, die durch ihre besondere anatomische Struktur den Transfer von Makromolekülen, insbesondere von maternalen Antikörpern, verhindert (Kruse, 1983). Als Konsequenz ist das agammaglobulinämisch geborene Kalb auf eine frühzeitige und reichliche Kolostrumversorgung angewiesen, um sich vor Infektionen zu schützen (Weaver et al., 2000). Kälber mit hohen IgG-Konzentrationen im Blut, die auf eine adäquate Kolostrumversorgung und -absorption schließen lassen, weisen eine wesentlich niedrigere Mortalitätsrate hinsichtlich Kälberdurchfall und Lungenentzündung auf als Kälber mit niedrigen IgG-Konzentrationen im Blut (Besser and Gay, 1985). Zudem kann eine bessere Entwicklung im Wachstum entsprechender Kälber festgestellt werden (Robison et al., 1988).

2.4 Immunglobuline

2.4.1 Verhältnisse der Immunglobuline im Kolostrum und Serum

Das Rind verfügt über vier verschiedene Immunglobuline: IgG1, IgG2, IgM und IgA (Butler, 1973). Die Konzentrationen der einzelnen Ig im Blutserum und Kolostrum variieren aufgrund verschiedener Faktoren, wie z.B. Alter, Rasse, Gesundheitsstatus und Laktationsphase der Mutterkuh (Butler and Brown, 1994; Guy et al., 1994).

IgG1 gelangt durch einen aktiven, rezeptorvermittelten Transport aus dem Blut in die sekretorischen Epithelzellen der Milchdrüse. Dies führt zu einer fünf- bis zehnfach höheren IgG1-Konzentration im Kolostrum verglichen mit der im Blut (Butler, 1983; Besser and Gay, 1994). Im Blutserum erwachsener Rinder liegt die mittlere IgG1-Konzentration bei ca. 11,2 g/l, während im Kolostrum eine Konzentration von bis zu 46,4 g/l und mehr erreicht werden kann (Butler and Brown, 1994). Schon 1973 (Butler) wurde bewiesen, dass IgG1 bis zu 80% der Ig im Kolostrum ausmacht.

Die zweite Subklasse IgG2 erreicht bei adulten Rindern eine durchschnittliche Blutserumkonzentration von 9,2 g/l, wohingegen der Gehalt im Kolostrum an IgG2 mit 2,9 g/l deutlich niedriger ist (Butler and Brown, 1994). Die durchschnittliche Blutserumkonzentration von IgM liegt bei 3 g/l, während im Kolostrum 6,8 g/l gemessen wurden (Butler and Brown, 1994). IgA ist im Kolostrum mit 5,4 g/l vertreten, im Blut dagegen nur mit 0,4 g/l (Butler and Brown, 1994). Sowohl IgA, als auch IgM werden lokal in den Plasmazellen der Milchdrüse produziert (Butler, 1973).

2.4.2 Funktion der Immunglobuline

Immunglobuline sind Proteine aus der Klasse der Globuline, die beim Rind und auch bei anderen Wirbeltieren als Reaktion auf Antigene gebildet werden. Immunglobuline (Ig) stehen im Dienste des Immunsystems und werden von den B-Lymphozyten produziert (Butler, 1998).

Die immunologische Funktion der Ig hängt von der einzelnen Immunglobulinklasse ab. IgG-Antikörper besitzen verschiedene Funktionen, worunter die komplementgebundene Reaktion gegen Pathogene zu einer der wichtigsten gehört. Sowohl IgG1 als auch IgG2 sind beim Rind in der Lage, die klassische Komplementkaskade zu aktivieren (McGuire et al., 1979; Schmeer et al., 1986). Weitere immunologische Reaktionen der IgG-Antikörper sind die Opsonierung und Neutralisation von Toxinen und Viren (Korhonen et al., 2000).

IgM-Antikörper bilden bei allen Vertebraten die Antikörper der „Erstantwort“ und sind sowohl als membrangebundene Form auf der Oberfläche der B-Zellen, sowie in gelöster Form im zirkulierenden Blut vorzufinden (Fellah et al., 1992; Fuentes-Panana et al., 2004). IgM-Antikörper sind ebenfalls in die Opsonierung, sowie die Komplementaktivierung involviert (Korhonen et al., 2000). Des Weiteren induziert IgM die Agglutinationsreaktionen, Hämolyse sowie Bakteriolyse (Horsch, 1977).

Die Funktion des in den Sekreten (außer in Kolostrum und Milch) dominierenden IgA besteht in der Agglutination von Antigenen sowie der Neutralisation von Toxinen und Viren (Korhonen et al., 2000), was speziell den Schleimhäuten des Gastrointestinal- und Respirationstraktes als lokaler Schutz dienen soll (Jawetz et al., 1977; Tizard, 1977).

2.4.3 Anreicherung der Immunglobuline im Kolostrum

Etwa vier Wochen vor der Geburt werden unter dem Einfluss von Östrogenen und Progesteron große Mengen an Immunglobulinen aus dem Blut über die Blut-Euter-Schranke in die Milchdrüse transportiert (Smith et al., 1971; Larson et al., 1980). Schätzungsweise 75-90% der im Kolostrum vorhandenen Proteine sind Immunglobuline (Butler and Brown, 1994). Während die beiden Unterklassen IgG1 und IgG2 im Blut in nahezu gleicher Konzentration vorliegen (Butler and Brown, 1994), wird IgG1 durch einen aktiven Transportmechanismus beim Übergang in das Kolostrum konzentriert und somit zum dominanten Ig im Kolostrum

(Porter,1973). Die Anwesenheit des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn), der sowohl im neonatalen Darmepithel als auch in der peripartalen Phase in den Epithelzellen der Milchdrüse lokalisiert ist, übernimmt eine entscheidende Rolle beim Transport von IgG1 (Mayer et al.,2002b, a; Mayer et al.,2005). Die Mehrheit der IgG1-Antikörper des Kolostrums wird dabei nahezu unverändert aus dem Blut der Mutter übernommen (Newby and Bourne,1977). Der Transfer von IgG2 in die Milchdrüse wird passiv durch einen nichtselektiven Transportmechanismus gewährleistet, wobei die größeren Mengen an IgG2 sowie auch IgM und IgA von den Plasmazellen der Milchdrüse produziert werden. Für IgG1 spielt die lokale Synthese dagegen keine Rolle (Lascelles,1979; Larson et al.,1980).

2.4.4 Absorption der Immunglobuline beim Kalb

Die Absorption der Immunglobuline beim neugeborenen Kalb wird von mehreren Faktoren beeinflusst: Der Zeitpunkt der ersten Kolostrumtränke, die Menge an Kolostrum, die Tränketchnik, der Geburtsverlauf und weitere Faktoren nehmen Einfluss auf die Resorption und folglich auf die Immunglobulinkonzentration im Blut (Stott et al., 1979a, b, c, d).

Die Enterozyten des neugeborenen Kalbes besitzen die Eigenschaft, Makromoleküle, darunter kolostrale Immunglobuline, innerhalb der ersten 24 bis 36 Lebensstunden zu absorbieren (Stott et al.,1979). Die Aufnahme intakter Immunglobuline ist aus dem Grund möglich, weil zum einen die Verdauungsenzyme anfangs noch nicht sezerniert werden und zum anderen die Trypsininhibitoren im Kolostrum die Immunglobuline vor einem proteolytischen Abbau schützen (Geene,1986). Neben unspezifischen Mechanismen, bei denen Immunglobuline mittels Pinozytose in Vesikel verpackt werden und durch Exozytose in die Lymphkapillaren abgegeben werden (Weaver et al., 2000), scheint auch der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) bei dem Transport von Bedeutung zu sein. Neugeborene besitzen FcRn-Rezeptoren in den Darmepithelzellen, welche IgG an ihrem Fc-Stück binden und somit den Transfer aus dem Darmlumen in das Kreislaufsystem bewerkstelligen (Kacskovics,2004). Auch beim Rind wurde kürzlich die Anwesenheit des neonatalen FcRn sowohl in der Milchdrüse als auch in den neonatalen Darmzellen nachgewiesen (Mayer et al.,2005). Da der neonatale FcRn in den sezernierenden Darmzellen statt in den Enterozyten lokalisiert ist, gehen

mehrere Forscher davon aus, dass der bovine FcRn keinen selektiven Transfer von IgG vermittelt, sondern vielmehr an der passiven Sekretion von IgG in den Darm beteiligt ist (Mayer et al.,2002b, a; Kacs Kovics,2004).

Die Weiterentwicklung der Enterozyten und des Verdauungsapparates bewirkt eine zeitliche Begrenzung der Immunglobulinabsorption aus dem Darmlumen. Etwa 24 Stunden nach der Geburt verlieren die Enterozyten die Fähigkeit, Immunglobuline intakt zu resorbieren (Stott et al.,1979). Eine Verzögerung der Kolostrumtränke bewirkt eine länger anhaltende Absorption von Immunglobulinen bis zu 36 Stunden *post natum* (Stott et al.,1979).

Aufgrund dieser zeitlichen Begrenzung der Fähigkeit zur Aufnahme von Immunglobulinen ist demnach eine rechtzeitige Kolostrumversorgung der Kälber essentiell. In den ersten vier Stunden p.n. herrscht ein maximaler Immunglobulintransfer durch die Darmschranke. Bereits zwölf Stunden nach der Geburt nimmt dieser Transfer jedoch stark ab (Bush and Staley,1980).

2.5 Immuntoleranz

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Abwehr von pathogenen Keimen unter gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Immuntoleranz (Selbsttoleranz). Innerhalb seiner frühen Entwicklungsperiode erwirbt der Organismus die Fähigkeit, keine immunologische Abwehrreaktion gegen körpereigene (Autoantigene) Strukturen durchzuführen (Janeway,1992; Zinkernagel,1993). In dieser Phase wird sichergestellt, dass weder T- noch B-Lymphozyten mit ihren Rezeptoren die körpereigenen Oberflächenstrukturen als „fremd“ betrachten und gegen diese eine Immunreaktion induzieren (Goodnow,1996).

Unter Autoimmunität versteht man eine Abweichung des Immunsystems (so genannter Verlust der Immuntoleranz), bei der die Zellen, insbesondere die T-Lymphozyten körpereigene Strukturen als fremd erkennen und eine Abwehrreaktion einleiten (Janeway,1992; Goodnow,1996). Oder es werden Autoantikörper gebildet, die körpereigenes Gewebe angreifen und zu dessen Eliminierung führen (Zinkernagel,1993). Eine Kombination von genetischer Disposition und äußeren Einflüssen, wie Infektionen oder Medikationen, wird als mögliche Ursache für eine Autoimmunitätsentwicklung postuliert (Pitkanen and Peterson,2003; Bach,2005).

2.5.1 Autoantikörper und Autoimmunerkrankungen

Treffen auf einen Organismus die oben genannten Faktoren (genetische Disposition und äußere Einflüsse) zu, ist die Entstehung von Autoimmunerkrankungen möglich, bei denen die Lymphozyten des körpereigenen Immunsystems beginnen, mit Autoantigenen zu reagieren (Goodnow,1996). CD4+ T-Lymphozyten erkennen diese Antigene fälschlicherweise als fremd an und induzieren eine Immunantwort (Bluestone and Abbas,2003; Miller,2004). Die falschen Informationen werden an die B-Zellen weitergeleitet, die daraufhin zu Plasmazellen differenzieren und Autoantikörper produzieren. Der systemische Lupus erythematoses ist ein klassisches Beispiel für eine T- und B-Zell-vermittelte Autoreaktivität (Chan and Shlomchik,1998; Chan et al.,1999; Wang and Shlomchik,1999). Die Autoantikörper markieren die als fremd erkannten Autoantigene, was zur Beseitigung dieser „körperfremden“ Strukturen mit anschließender Schädigung des betroffenen Organs führt (Naparstek and Plotz,1993).

Eine weitere Möglichkeit der Entstehung einer Autoimmunantwort liegt im Mechanismus der so genannten molekularen Mimikry, bei dem der Erreger eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem körpereigenen Gewebe aufweist und sich somit tarnt, um nicht als fremd erkannt zu werden (Oldstone,1987; Christen and von Herrath,2004). Werden diese Pathogene trotzdem vom Immunsystem als Antigen erkannt, kann sich die darauf folgende Immunreaktion nicht nur gegen den Erreger, sondern auch gegen körpereigenes Gewebe richten (Cusick et al.,2011). Es wird diskutiert, ob bspw. die Multiple Sklerose beim Menschen dem Mechanismus der molekularen Mimikry unterliegt (Olson et al.,2005).

Ein klassisches Beispiel für eine Autoimmunerkrankung in der Veterinärmedizin ist die autoimmunhämolytische Anämie bei Hund und Katze (AHIA), der eine Autoantikörper-vermittelte zytotoxische Zerstörung der körpereigenen zirkulierenden Erythrozyten zugrunde liegt (McCullough,2003). Die Bindung von IgG- oder IgM-Antikörpern und Komplement an der Oberfläche der Erythrozyten initiiert die immunologische Zerstörung, was im Verlaufe der Krankheit mit einer hochgradigen Anämie und sekundären Entzündungserscheinungen einhergeht (McCullough,2003; Balch and Mackin,2007). Die Ätiologie ist bislang ungeklärt. Als Ursache werden hereditäre Erythrozytendefekte, Medikamente, Infektionen, Impfungen, Neoplasien und ebenso andere Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematoses) diskutiert (McCullough,2003).

Eine weitere für die Veterinär- und auch Humanmedizin bedeutungsvolle Autoimmunerkrankung ist die Myasthenia gravis, die sowohl beim Hund als auch beim Menschen auftreten kann (Juel and Massey,2007; Gajanayake et al.,2008). Als Ursache wird die Bildung von Autoantikörpern gegen den Acetylcholinrezeptor sowie gegen den muskelspezifischen Tyrosinkinase-rezeptor verantwortlich gemacht, welche die Signalübertragung zwischen Nerv und Muskel inhibieren und letztendlich zu den schlaffen Lähmungen führen (Gajanayake et al.,2008).

Nicht zwingend ist die Bildung von Autoantikörpern mit der Entstehung einer Autoimmunerkrankung verbunden (Cojocaru et al.,2009). Neben den bereits bekannten natürlich vorkommenden Antikörpern (natural antibodies), die u.a. auch im bovinen Kolostrum und Blutserum existieren (Ploegaert et al.,2011), wird seit mehreren Jahrzehnten die Beteiligung von natürlichen Autoantikörpern (natural autoantibodies, Nab) an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz erforscht und diskutiert (Cojocaru et al.,2009; Ehrenstein and Notley,2010). Die natürlichen Autoantikörper sind mit circa 20% der im Blut zirkulierenden Immunglobuline vertreten und reagieren sowohl gegen Selbstantigene als auch gegen Fremdantigene (Ochsenbein and Zinkernagel,2000; Cojocaru et al.,2009). Beim Menschen kann man zwischen Nab der Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA unterscheiden, wobei den IgM-Autoantikörpern die wichtigste Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems zugesprochen wird (Ochsenbein and Zinkernagel,2000; Ehrenstein and Notley,2010). Durch vorzeitige Eliminierung von pathogenen, apoptotischen oder tumorösen Zellen wird eine überflüssige Entstehung einer Autoimmunreaktion verhindert (Ochsenbein and Zinkernagel,2000). Darüber hinaus regulieren sich autoreaktive B- und T-Zellen über einen negativen Suppressionsmechanismus selbst (Zelenay et al.,2007), der ebenfalls ein Überschießen der Autoantikörperproduktion mit anschließender Autoreaktivität inhibiert (Cohen,2000).

2.5.2 Alloantikörper und Alloimmunerkrankungen

Unter Alloantikörpern versteht man jene Antikörper, die von einem Organismus gebildet werden und gegen ein körperfremdes Antigen gerichtet sind, das von einem

anderen Organismus derselben biologischen Spezies stammt (Arakelov and Lakkis,2000). Sie haben vor allem bei Organtransplantationen, Schwangerschaften (Rhesus-Inkompatibilität) sowie bei der Blutgruppenunverträglichkeit des AB0-Antigensystems klinische Bedeutung (Pfisterer et al.,1968; Huizing et al.,2008; Ahmed et al.,2011).

Bei dem AB0-Antigensystem spielen die "natürlichen" Alloantikörper eine entscheidende Rolle (Cojocaru et al.,2009). Diese sind prinzipiell vorhanden, auch wenn einem Organismus das korrespondierende Alloantigen fehlt. Das AB0-System charakterisiert sich durch die im Plasma jedes Vertebraten natürlich vorkommenden Antikörper, die sich jeweils gegen die AB0-Antigene richten, die jener Organismus selbst nicht trägt (Landsteiner,1901; Pfisterer et al.,1968). Diese natürlichen Antikörper können im Rahmen einer Bluttransfusion zu gravierenden Transfusionsreaktionen führen, was bei der Auswahl von Blutprodukten stets berücksichtigt werden muss (Pfisterer et al.,1968).

Verschiedene Alloimmunerkrankungen wurden bislang bei Pferden, Schweinen und Menschen, seltener jedoch bei Rindern beschrieben (Dowsett et al.,1978; Buechner-Maxwell et al.,1997; Boyle et al.,2005; Kaplan,2006; Forster,2007; Gramatges et al.,2009).

Die neonatale Isoerythrolyse ist eine Form der immunhämolytischen Anämie, bei der maternale Alloantikörper die Hämolyse von Erythrozyten des Neugeborenen induzieren. Sie kann grundsätzlich bei allen Haussäugetierarten wie z.B. bei Katzen (Silvestre-Ferreira and Pastor,2010) auftreten und entspricht dem Mechanismus der Rhesus-Inkompatibilität des Menschen (Weinstein,1982; Huizing et al.,2008). Allerdings spielt die anatomische Struktur der Plazenta der jeweiligen Spezies für die zeitliche Manifestation der Erkrankung eine große Rolle. Während beim Menschen die Placenta hämochorialis (dreischichtig) bereits im Mutterleib einen diaplazentaren Transfer von IgG zulässt, und so der Fetus schon während der Schwangerschaft durch antierythrozytäre Alloantikörper geschädigt werden kann, findet bei Pferden, Schweinen und Rindern aufgrund der sechsschichtigen Placenta epitheliochorialis während der Gravidität kein Austausch von Makromolekülen statt (Schnorr and Kressin,2001). Demzufolge ist das Neugeborene erstmals nach der Aufnahme von Kolostrum mit den antierythrozytären Alloantikörpern konfrontiert.

Die neonatale Isoerythrolyse beim Fohlen erfolgt ebenfalls aus einer alloimmun-

bedingten Hämolyse der neonatalen Erythrozyten infolge von Kolostrumaufnahme (Buechner-Maxwell et al.,1997). Die erythrozytenschädigenden Alloantikörper werden von der Stute produziert, nachdem sie mit Erythrozyten in Kontakt getreten sind, die eine andere Antigenstruktur als die eigenen besitzen. Dies sind meistens die Erythrozyten des Fohlens, die Oberflächenantigene paternalen Ursprungs aufweisen und sich demnach von denen der Stute unterscheiden (Buechner-Maxwell et al.,1997). Meist treten die Erythrozyten des Fohlens gegen Ende der Gravidität mit dem maternalen Blutkreislauf in Kontakt, wenn die Bewegungen der schweren Frucht zu Plazentaläsionen und den daraus folgenden Blutungen führen (Franks,1962). Eine weitere Möglichkeit der Immunisierung der Stute bringt die Bluttransfusion mit sich, die zwar in der Intensivmedizin zunehmend an Bedeutung gewinnt, in manchen Fällen jedoch bei der Stute die Immunisierung gegen inkompatible Blutgruppenstrukturen induziert (Kähn et al.,1991).

Bei Ferkeln kann eine neonatale alloimmunbedingte Thrombozytopenie aufgrund kolostraler antithrombozytärer Alloantikörper auftreten, die mit einer hämorrhagischen Diathese der Neugeborenen einhergeht. Grund für diese Alloimmunerkrankung sind Oberflächenantigene an Thrombozyten paternalen Ursprungs, die inkompatibel mit denen der Sau sind, woraufhin sie immunisiert wird (Forster,2007).

Die fetale oder neonatale alloimmune Thrombozytopenie (und Neutropenie) des Menschen (FAIT/NAIT) entsteht mit der Bildung maternaler Alloantikörper, die gegen spezifische Thrombozyten- und Leukozytenantigene paternalen Ursprungs gerichtet sind (Kaplan,2006; Gramatges et al.,2009). Besitzt der Fetus nun die paternalen Alloantigene, wird die Mutter daraufhin immunisiert und produziert Alloantikörper gegen ihr eigenes Kind. Anders als bei den oben genannten Haussäugetieren gelangen die Alloantikörper bereits während der Schwangerschaft in den fetalen Kreislauf, wo sie die Thrombozyten sowie Leukozyten des Ungeborenen zerstören (Gramatges et al.,2009).

Zwischen 1963 und 1969 wurde über das Auftreten der „Isoimmunhämolytischen Anämie bei neugeborenen Kälbern“ aus Australien berichtet (Dimmock and Bell,1970; Dowsett et al.,1978). Nach Kolostrumaufnahme griffen die isohämolysierenden Antikörper die Erythrozyten der neugeborenen Kälber innerhalb der ersten 24 Lebensstunden an und führten zu einer hämolytischen Anämie infolge einer disseminierten intravasalen Gerinnung (Dowsett et al.,1978). Im Alter zwischen

zwei und zehn Tagen verstarben die Kälber aufgrund massiver Blutverluste (Dowsett et al.,1978). Die Krankheit betraf ausschließlich Kälber von Kühen, die vor oder während der Gravidität mit einer rinderbluthaltigen Lebendvakzine gegen Babesiose geimpft worden waren (Dimmock,1973; Bock and de Vos,2001). Diese Mütter produzierten nach Kontakt mit den immunogenen Blutgruppen-Antigenen isohämolysierende Alloantikörper, die ausschließlich gegen die Erythrozytenantigene des Kalbes gerichtet waren, sofern der Fetus die entsprechenden Alloantigene auf den Erythrozyten exprimierte (Dowsett et al.,1978).

Die Tatsache, dass die Muttertierimpfung gegen bovine Babesiose für eine alloimmunhämolytische Anämie bei neugeborenen Kälbern verantwortlich war, lässt eine ebenfalls impfinduzierte Alloantikörper-vermittelte Erkrankung als Ursache für BNP vermuten.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Puffer und Lösungen

3.1.1 Puffer und Lösungen zur Lymphozytenpräparation

Trennlösung zur Isolierung von PBL während der Dichtegradientenzentrifugation

Biocoll Trennlösung 1,077g/ml¹, gebrauchsfertig.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

NaCl ² (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g

ad 1000 ml Aqua dest.

3.1.2 Puffer und Lösungen zur Aufbereitung der kolostralen Antikörper

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

NaCl (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g

ad 1000 ml Aqua dest.

Puffer A:

Borsäure (0,1 M)	61,83g
Na-Tetraborat (0,025 M)	38,14g
NaCl (0,075 M)	58,44g

¹ Fa. Biochrom AG, Berlin

² Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien: Fa. AppliChem, Darmstadt

ad 5 l Aqua bidest.

pH 8,4 einstellen mit NaOH

Puffer B:

Wie Puffer A, nur pH 9,5 mit NaOH einstellen

3.1.3 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

NaCl (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g
Tween-20 (0,05%)	0,50 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

PBS-Tween-Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP) Lösung, pH 7,2

Polyvinylpyrrolidone ³ (PVP40)	10,00 g
---	---------

ad 1000 ml PBS-T.

3.1.4 Färbelösungen

Diaminobenzidin (DAB)⁴

Mayers Hämlaun⁵

³ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁴ Fa. Linaris, Wertheim

⁵ Fa. Merck, Darmstadt

3.2 Probenmaterial

3.2.1 Kolostrum und Tiere

Für diese Arbeit wurden die Kolostrum von insgesamt zehn BNP-Überträgerkühen aus verschiedenen Betrieben untersucht. Das Kolostrum wurde von jenen Kühen gewonnen, die mindestens ein an BNP erkranktes Kalb zur Welt gebracht hatten. Die Diagnose der bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP) erfolgte anhand klinischer Kriterien, wie etwa Thrombozytopenie und Leukozytopenie mit einer Knochenmarksschädigung (Friedrich et al., 2009; Kappe et al., 2010). Die an BNP erkrankten Kälber waren entweder Patienten der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilian-Universität in München oder wurden im Zuge hämatologischer Untersuchungen der eingegangenen Blutproben im Labor der Klinik anhand der typischen Kriterien (hochgradige Thrombozytopenie und Leukozytopenie) als solche diagnostiziert. Für die Experimente gab es keine Vorauswahl der Proben; es wurde Kolostrum der Mutterkühe (von den jeweiligen Besitzern zur Verfügung gestellt) des jeweils nächsten in der Klinik für Wiederkäuer diagnostizierten BNP-Patienten in die Untersuchung miteinbezogen. Alle zehn BNP-Überträgerkühe hatten mindestens zwei Injektionen mit dem inaktivierten BVD Impfstoff, Pregsure BVD⁶ erhalten.

Die Kontrollgruppe, bestehend aus zehn Kühen, wurde dann entsprechend der Information, dass keine dieser Kühe ein BNP-Kalb zur Welt gebracht hatte, passend zu den BNP-Proben ausgesucht. Alle bis auf drei Kontrollkühe stammten aus einem BVD-freien Betrieb. Die übrigen drei Probanden hatten auch eine Immunisierung mit gleichnamigem Impfstoff wie die BNP-Überträgerkühe erhalten.

Die Probanden beider Gruppen waren zum Zeitpunkt der Kolostrumgewinnung klinisch unauffällig. Auch die hämatologische Untersuchung wies keinerlei Abweichungen auf. Des Weiteren erhielten die Probanden zur peripartalen Zeit keine Medikation und entwickelten die Neugeborenen auf natürlichem Weg. In dieser Studie mussten die Probanden einen negativen Befund auf BVD-Antigen aufweisen, um eine mögliche BVD-Infektion ausschließen zu können, die sich auf die Ergebnisse auswirken könnte.

⁶ Fa. Pfizer, Deutschland

3.2.2 Direkte Konjugation der kolostralen Antikörper

Die zu untersuchenden Kolostren wurden innerhalb der ersten vier Stunden *post partum* gewonnen, sofort aliquotiert (1,5 ml) und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Bestimmung der Antikörper gebundenen Zellsubpopulationen wurden die Kolostren beider Gruppen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)⁷ direkt konjugiert, um unerwünschte Doppelbindungen von entsprechend eingesetzten sekundären anti-bovinen Antikörpern mit den B-Lymphozyten der bovinen Blutspender zu vermeiden. Die Methode erfolgte nach folgendem Protokoll von Andreas Radbruch (2000):

Tag 1:

- die gewünschte Menge Kolostrum (Ak) 10 min bei 1900 x g zentrifugieren
- den Überstand abpipettieren und in Dialyseschläuche füllen (vorher Schläuche in Puffer A wässern)
- die Dialyseschläuche in Puffer A (pH 8,4) über Nacht umpuffern (Kühlraum)

Tag 2:

- die Dialyseschläuche 1 Stunde in Puffer B umpuffern
- den umgepufferten AK entnehmen und die Proteinkonzentration am Spektrometer⁸ messen
- anschließend die AK-Konzentration auf 1 mg/ml einstellen
- Fluoresceinisothiocyanat (FITC) in N,N-Dimethylformamid⁹ (DMF) (2mg/ml) auflösen
- 100 µl gelöstes FITC pro 1ml AK-Lösung ansetzen
- 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Rotator inkubieren
- anschließend den konjugierten AK in Dialyseschläuche füllen und über Nacht in 5 Liter PBS (pH 7,2) bei 4°C umpuffern

Tag 3:

⁷ Fa. Sigma, Deisenhofen

⁸ Fa. Nano Drop, USA

⁹ Fa. Sigma, Deisenhofen

- die AK-Lösung aus den Dialyseschläuchen nehmen
- 10 min bei 1900 x g zentrifugieren
- den Überstand abpipettieren und bei +4 °C im Kühlschrank lagern

3.3 Gewinnung von peripheren Blut-Leukozyten (PBL) und Thrombozyten

Die peripheren Blutleukozyten (PBL), sowie die Thrombozyten wurden aus Vollblut von insgesamt 20 gesunden Rindern verschiedenen Alters (Kälber im Alter zwischen 0 und vier Wochen und Rinder ab neun Monate bis vier Jahre) gewonnen. Die Probanden waren zur Zeit der Blutabnahme klinisch gesund und standen nicht unter Medikation.

Nach Desinfektion der Injektionsstelle wurde den Rindern ca. 40-60 ml Blut aus der Vena jugularis entnommen und in mit Lithium-Heparin beschichtete Probenröhrchen¹⁰ abgefüllt. Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur aufgestellt und zunächst mit PBS (pH 7,4) 1:3 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 5ml des verdünnten Blutes entnommen und in 50 ml Röhrchen¹¹ zu gleichen Teilen auf Biocoll Trennlösung¹² geschichtet. Die nach der Dichtegradientenzentrifugation (25°C, 515 x g, 30 min, Bremse ausgeschaltet) zwischen Plasma und Biocoll entstandene leukozytenreiche Interphase wurde unter möglichst minimaler Aspiration der Biocoll Trennlösung abgenommen. Ab diesem Schritt wurden die Zellen durchgehend gekühlt (4°C) weiterpräpariert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit kaltem PBS zwei Mal zehn Minuten gewaschen. Der nach Zentrifugation bei 515 x g entstandene Überstand wurde dekantiert und das gewonnene Pellet mit frischem PBS re-suspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann nach der Zellzählung für die Immunzytologie verwendet.

Um die Thrombozyten für die Identifikation der Leukozytenpopulationen in den Doppelfärbungen zu eliminieren, wurde ein Teil des gewonnen Vollblutes zuerst bei 1000 x g (10 min, 25°C, Bremse ausgeschaltet) zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende thrombozytenreiche Plasma verworfen und nach oben beschriebener Methode weiter verfahren. Dieselbe Methodik wurde parallel mit in

¹⁰ Fa. Sarstedt, Nürnberg

¹¹ Fa. Sarstedt, Nürnberg

¹² Fa. Biochrom, Berlin

EDTA beschichteten Probenröhren¹³ gewonnenem Vollblut durchgeführt und erwies sich ebenfalls als eine geeignete Technik. Folglich wurden die thrombozytenfreien PBL-Präparate aus beiden Techniken für die immunzytochemischen Untersuchungen verwendet.

3.3.1 Zählen der gewonnenen Leukozyten

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl der Probe wurden je 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und von dieser Mischung 10 µl in eine Neubauer-improved Zählkammer¹⁴ gegeben. Dann wurden von den vorliegenden 25 Gruppenquadraten diagonal 5 Gruppenquadrate ausgezählt und zur Bestimmung der Zellzahl pro ml die Anzahl der Zellen mit 5×10^4 multipliziert. Zur Berücksichtigung der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau wurde der errechnete Wert zudem mit 2 multipliziert. Die Zellzahl wurde demnach wie folgt errechnet:

$$\text{gezählte Zellen} \times 5 \times 10^4 \times 2 = \text{Zellen pro ml.}$$

Für die Zytologiepräparation wurden die jeweilig gezählten Zellen auf eine Endkonzentration von ca. 2×10^4 Leukozyten/ml verdünnt.

3.3.2 Aufbereitung der PBL

Zur späteren Verwendung der PBL (mit oder ohne Thrombozyten) für die Immunzytologie wurden 2 µl der Zellsuspension auf geschliffene Objektträger¹⁵ (SuperfrostPlus) pipettiert, luftgetrocknet und anschließend für 10 Minuten in eiskaltem Aceton fixiert.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zytologiepräparate bei -20°C asserviert.

¹³ Fa. Sarstedt, Nürnberg

¹⁴ Fa. NeoLab, Heidelberg

¹⁵ Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig

3.4 Immunzytochemische Untersuchungen

3.4.1 Quantitative Analyse der Antikörperbindungen

Für die statistische Analyse der Alloantikörperbindungen an den bovinen Blutzellen wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Da weder für die Kolostren noch für einige sekundäre anti-bovine Antikörper Konzentrationsangaben bekannt waren, mussten diese zunächst in einer Verdünnungsreihe ermittelt werden. Bei dieser Art der Verdünnungsreihen wurden alle Verdünnungsstufen aus ein und derselben Ausgangslösung (Kolostrum oder sekundärer Ak) hergestellt und nicht durch fortgesetztes Verdünnen. Für das Kolostrum wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:10.000, 1:25.000, 1:50.000, 1:100.000 angesetzt und für die sekundären anti-bovinen IgM- sowie IgG-Antikörper jeweils 1:500, 1:1.000, 1:2.500 und gegebenenfalls optimiert. Als Verdünnungsmedium wurde PVP-T verwendet.

Die immunzytochemische Färbung erfolgte zunächst durch die Fixierung der Schnitte (PBL mit Thrombozyten) in eiskaltem Aceton für 10 min und anschließend nach folgendem Protokoll:

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Blockieren mit 5% Kaninchen- oder Schafserum 1:20 in PVP-T für 40 min.

Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper:

BNP- oder Kontroll-Kolostrum	1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:10.000, 1:25.000, 1:100.000 in PVP-T
------------------------------	--

über Nacht bei 4°C.

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Inkubation mit den entsprechenden polyklonalen sekundären Antikörpern

Schaf anti-Rind-IgG1 POD ¹⁶	1:50 in PVP-T
Schaf anti-Rind-IgG2 POD ¹⁷	1:50 in PVP-T
Kaninchen anti-Rind IgM POD ¹⁸	1:500, 1:1.000, 1:2.500 in PVP-T

¹⁶ Fa. Serotec, Düsseldorf

¹⁷ Fa. Serotec, Düsseldorf

Kaninchen anti-Rind IgG POD¹⁹ 1:500, 1:1.000, 1:2.500 in PVP-T
2 h bei Raumtemperatur.

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Die Färbung wurde mittels des Substrats Kit DAB (3,3'-Diaminobenzidin)²⁰ erzielt, welches ein braunes Endprodukt bildet. Jeder Objektträger wurde exakt eine Minute mit DAB versehen und anschließend für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun²¹ für eine Minute. Danach wurden die Objektträger 15 min. unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Abschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 5 min. entwässert (Ethanol 70%, Ethanol 96%, Isopropanol, Xylol 1 und Xylol 2) und mit Fluka Eukitt²² quick-hardening mounting medium eingedeckelt.

Die Schnitte wurden mit dem digitalen Leica DFC320 Mikroskop²³ in 40- und 100-facher Optik analysiert und fotografiert und anschließend mit Adobe Photoshop C5 beurteilt und visuell dokumentiert.

3.4.2 Charakterisierung der kolostralen BNP transferierenden Antikörper

Für die Bestimmung der Immunglobulinklassen der kolostralen BNP transferierenden Antikörper wurden die Zytologiepräparate (PBL mit Thrombozyten) zunächst in eiskaltem Aceton für 10 min fixiert. Anschließend wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Blockieren mit 5% Schafserum 1:20 in PVP-T für 40 min.

¹⁸ Fa. Rockland, Washington, USA

¹⁹ Fa. Rockland, Washington, USA

²⁰ Fa. Linaris, Wertheim

²¹ Fa. Merck, Darmstadt

²² Fa. Sigma, Deisenhofen

²³ Fa. Leitz, Wetzlar

Inkubation mit den primären Antikörpern (die Konzentrationsangaben der Kolostren ergeben sich aus 3.4.1)

BNP- oder Kontroll-Kolostrum 1:10.000 in PVP-T

über Nacht bei °4 C

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Inkubation mit dem entsprechenden polyklonalen sekundären Antikörper²⁴

Schaf anti-Rind IgG FITC 1:50 in PVP-T

Schaf anti-Rind IgG1 FITC 1:50 in PVP-T

Schaf anti-Rind IgG2 FITC 1:50 in PVP-T

Schaf anti-Rind IgM FITC 1:50 in PVP-T

30 min bei Raumtemperatur.

Die Kernfärbung erfolgte gleichzeitig mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)²⁵.

2 x 10 min. waschen in PBS-T. Abschließend wurden die Schnitte mit Dako fluorescent mounting Medium²⁶ eingedeckelt.

3.4.3 Bestimmung der Zielzellpopulation

Für die Identifizierung der einzelnen Zielzellpopulationen wurden folgende CD-Marker (primäre Antikörper)²⁷ verwendet:

Antikörper	Entwickelt in	Zielzelle	Spezifität	Klonalität	Firma/Herkunft
Anti-CD4	Maus	T-Helfer Zellen	anti-bovin	monoklonal	AbD Serotec
Anti-CD8	Maus	Zytotoxische T-Zellen	anti-bovin	monoklonal	AbD Serotec
Anti-CD14	Maus	Monozyten	anti-bovin	monoklonal	AbD Serotec
Anti-CD21	Maus	B-Zellen	anti-Human	monoklonal	AbD Serotec
Anti-CD41/61	Maus	Thrombozyten	anti-bovin	monoklonal	VMRD ²⁸
Anti-CD172a	Maus	Granulozyten	anti-bovin	monoklonal	AbD Serotec

Tab.1: Verwendete primäre Antikörper für die Identifikation der Zielzellpopulationen

²⁴ Fa. AbD Serotec, Düsseldorf

²⁵ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

²⁶ Fa. DAKO, Hamburg

²⁷ Fa. Serotec, Düsseldorf

²⁸ Fa. VMRD, Pullmann, WA, USA

Blockieren mit Ziegenserum 1:20 in PVP-T für 40 min.

Inkubation der Schnitte (PBL mit und ohne Thrombozyten) mit dem ersten primären Antikörper (direkt gelabelt mit FITC).

BNP- oder Kontroll-Kolostrum FITC 1:500 in PVP-T
über Nacht bei 4°C.

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Inkubation mit den zweiten primären Antikörpern (aus Tab.1):

anti-CD4	1:50 in PVP-T
anti-CD8	1:50 in PVP-T
anti-CD14	1:50 in PVP-T
anti-CD21	1:50 in PVP-T
anti-CD41/61	1:50 in PVP-T
anti-CD172a	1:50 in PVP-T

3-4 h bei Raumtemperatur.

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG Alexa568²⁹ 1:500 in PVP-T
30 min. bei RT.

Die Kernfärbung erfolgte gleichzeitig mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)³⁰.

2 x 10 min. waschen in PBS-T.

Abschließend wurden die Schnitte mit Dako fluorescent mounting Medium³¹ eingedeckelt. Die Bindungsmuster der Antikörper gebundenen Thrombozyten, sowie Leukozytenpopulationen wurden mit dem Mikroskop Axio Imager M1³² und der Software AxioVision 4.³³ beurteilt und dokumentiert.

²⁹ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

³⁰ Fa. Invitrogen, Karlsruhe

³¹ Fa. DAKO, Hamburg

³² Fa. Carl Zeiss, Oberkochen

³³ Fa. Carl Zeiss, Oberkochen

3.5 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Immunzytochemie wurden die jeweiligen Antikörperbindungen von BNP- und Kontroll-Kolostren ermittelt. Die Normalverteilung der Bindungshäufigkeit zwischen Kontroll- und BNP Proben wurde zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft.

Sowohl für IgG2, als auch für IgM war dieser Test nicht signifikant ($p > 0,05$), womit eine Normalverteilung vorlag und die statistische Auswertung daher mit dem Student's *t*-Test erfolgte. Der Kolmogorov-Smirnov Test war für IgG1 signifikant ($p < 0,05$), somit lag keine Normalverteilung vor, und es wurde der Mann-Whitney Test zur statistischen Auswertung verwendet. Mit Hilfe der Prism 5.0 GraphPadSoftware³⁴ für Windows erfolgte die Darstellung der Antikörperbindungen beider Gruppen in einem Säulendiagramm.

³⁴ Graphpad Software, CA, USA

4 ERGEBNISSE

4.1 Ermittlung der Konzentrationen von Kolostrum und sekundären Antikörpern

Bisher existierte noch kein Protokoll über den Einsatz von bovinem Kolostrum in der Immunzytologie und folglich auch noch keine Konzentrationsangaben. Darüber hinaus waren die idealen Konzentrationen der sekundären anti-bovinen IgG- und IgM-Antikörper (POD markiert) ebenfalls unbekannt. Um also gute Ergebnisse bei den immunzytologischen Untersuchungen zu erlangen, wurde in dieser Arbeit zunächst eine Verdünnungsreihe beider Kolostrum-Gruppen (Kontrolle und BNP-Überträger) sowie der sekundären anti-bovinen IgM- und IgG-Antikörper angefertigt und in einer Titrationskurve (Abb. 4.1) ermittelt und analysiert.

Für die Ermittlung der IgM-Antikörperbindungen an bovinen Blutzellen wurde bei einer Verdünnung des Kolostrums von 1:5.000 sowohl für die Kontrollgruppe (Abb. 4.1A), als auch für die BNP-Überträgergruppe (gestrichelte Linie, Abb. 4.1A) mit ca. 18-22% IgM-Antikörper gebundener PBL ein Peak beobachtet, der bei der nächst höheren Verdünnung von 1:10.000 mit 10-15% IgM-Antikörperpositiven PBL leicht abfiel. Bei einer Verdünnung von 1:25.000 wurden wiederum circa 5% mehr PBL von IgM-Antikörpern des BNP-Kolostrums gebunden (gestrichelte Linie, Abb. 4.1A). Die Unterschiede zwischen diesen drei Verdünnungsstufen waren folglich sehr minimal. In den nächst höheren Verdünnungen fiel die Titrationskurve schließlich bis auf 0 ab. Wie sich in den folgenden Untersuchungen herausstellte (Abb. 4.3), eignete sich für die weitere Analyse der IgM-Antikörperbindungen an den PBL eine Kolostrumverdünnung von 1:10.000 am besten.

Für die Detektion der IgG-Antikörperbindungen an bovinen Blutzellen wurde bei einer Verdünnung des Kolostrums von 1:10.000 sowohl für die Kontrollgruppe (Abb. 4.1B), als auch für die BNP-Überträgergruppe (gestrichelte Linie, Abb. 4.1B) mit ca. 20% (Kontrolle) und 65% (Überträger) IgG-Antikörper gebundener PBL ein Peak beobachtet. Die Titrationskurve fiel bei 1:25.000 stark ab und kam in den darauffolgenden Verdünnungen auf 0 zu liegen (Abb. 4.1B). Daraufhin wurde für die weitere Analyse der IgG-Antikörperbindungen an den Blutzellen ebenfalls eine Kolostrumverdünnung von 1:10.000 festgelegt.

Im nächsten Schritt wurde eine Verdünnungsreihe der anti-bovinen IgM- (Abb. 4.1C) und IgG-Antikörper (Abb. 4.1D) beginnend mit 1:500, 1:1.000 bis 1:2.500 hergestellt, um Aufschluss über die optimale Konzentration der zu untersuchenden Antikörper im Kolostrum zu erlangen. Bei einer Verdünnung von 1:1.000 (anti-boviner IgM-Ak) und 1:500 (anti-boviner IgG-Ak) entsprachen die Prozentzahlen der IgM- und IgG-Antikörper gebundenen PBL mit ca. <20% (IgM) und 65% (IgG) den Resultaten aus vorangegangener Untersuchung, woraufhin die nachfolgenden Versuche mit den anti-bovinen IgM-Antikörpern bei einer Verdünnung von 1:1.000 und mit den anti-bovinen IgG-Antikörpern bei einer Verdünnung von 1:500 durchgeführt wurden.

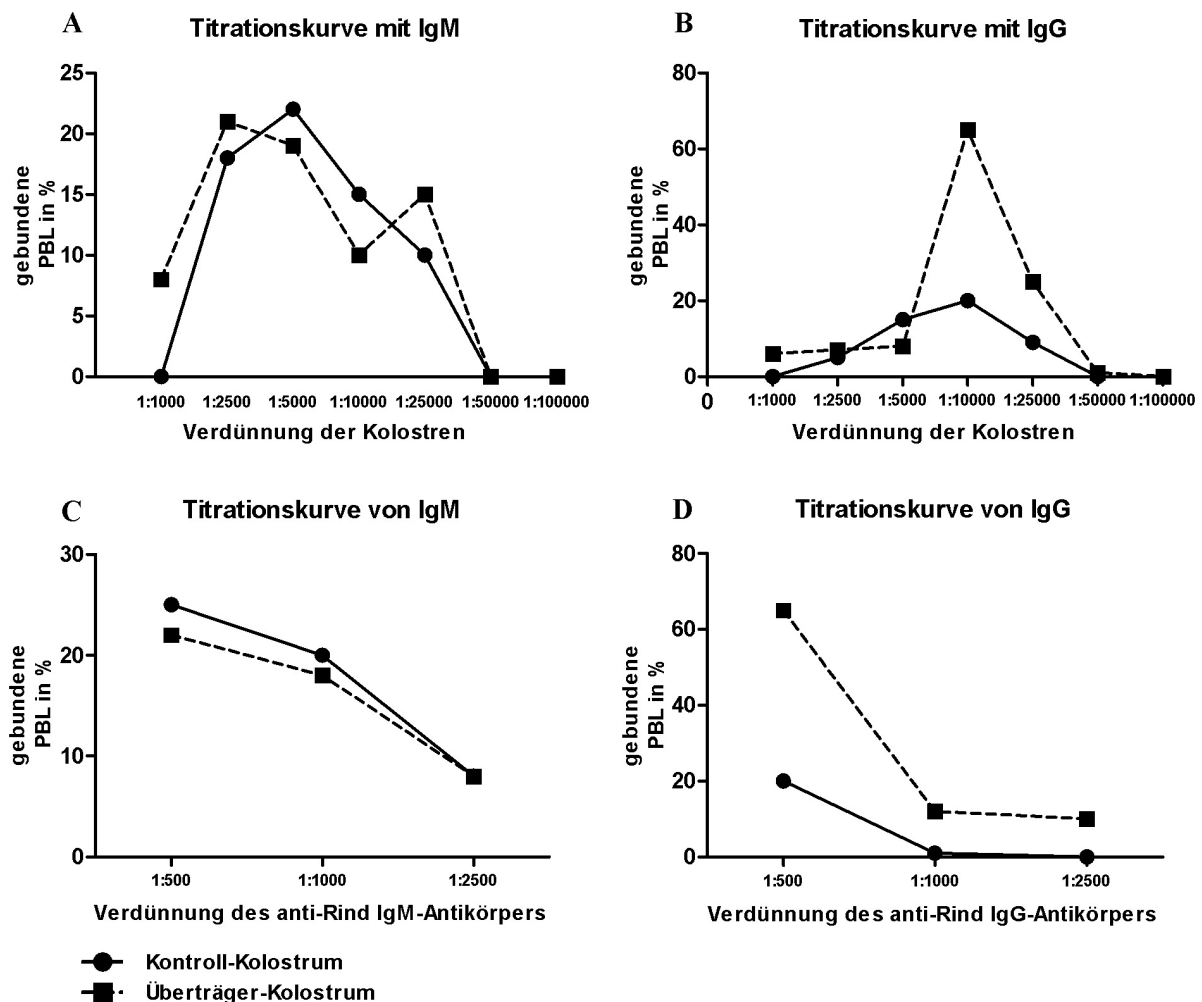


Abb.4.1: Ermittlung der Konzentrationen der Kontroll- sowie BNP-Kolostrum und der Konzentrationen der anti-bovinen IgM- und IgG-Antikörper mit Hilfe der Erstellung einer Verdünnungsreihe. Als Beispiel jeweils ein repräsentatives Kolostrum beider Untersuchungsgruppen. (A) Darstellung der kolostralen IgM-Antikörperbindungen an den PBL eines gesunden Kalbes (männlich, 17 Tage, FV). (B)

Darstellung der kolostralen IgG-Antikörperbindungen an den PBL eines gesunden Kalbes (weiblich, 23 Tage alt, Kreuzung). Die Kolostren wurden jeweils in sieben verschiedenen Konzentrationen mit aufsteigender Verdünnung inkubiert. (C) Darstellung der kolostralen IgM-Antikörperbindungen an den PBL eines gesunden Kalbes (m, 17 Tage, FV) mit aufsteigender Verdünnung des sekundären anti-bovinen IgM-Antikörpers. (D) Darstellung der kolostralen IgG-Antikörperbindungen an den PBL eines gesunden Kalbes (w, 23 Tage, Kreuzung) mit aufsteigender Verdünnung des anti-bovinen IgG-Antikörpers.

4.2 Identifikation der BNP transferierenden Antikörper im Kolostrum

Während in vorangegangener Versuchsreihe (Abb. 4.1) die Konzentrationen beider Kolostrum-Gruppen ermittelt wurde, konnte zwischen dem Einsatz der sekundären anti-bovinen IgM- und IgG-Antikörper bereits ein deutlicher Unterschied bezüglich der Antikörperbindungen aus BNP-Kolostren an den peripheren Blutleukozyten (PBL) der Probanden beobachtet werden.

Für die weitere Analyse der Antikörperbindungen (IgM und IgG) wurden PBL gesunder Probanden mit BNP-Kolostren von definierten Überträgerkühen inkubiert. Die Ermittlung der Antikörperbindungen erfolgte durch den Einsatz sekundärer, mit FITC (grün) konjugierter anti-boviner IgM- (Abb. 4.2A) und IgG-Antikörper (Abb. 4.2B). Darüber hinaus wurden die kernlosen Thrombozyten, die sich nicht mit Kernfarbstoffen anfärben lassen, mittels eines spezifischen CD-Markers (CD41/61+: rot) identifiziert. So konnte schon einmal ein Überblick über die kolostralen Antikörperbindungen an allen peripheren Blutzellen geschaffen werden.

Interessanterweise wurden die CD41/61+ Thrombozyten nicht von IgM-Antikörpern gebunden (Abb. 4.2A, rot) und waren demnach ausschließlich rot. Des Weiteren zeigten ca. 15-20% der PBL IgM-Antikörperpositive Reaktionen (Abb. 4.2A, grün), analog zu der im Vorfeld durchgeführten Untersuchungen (Abb. 4.1A, Abb. 4.1C).

Der Einsatz von anti-bovinen IgG-Antikörpern ergab deutliche Unterschiede bei den Antikörperbindungen an Thrombozyten und auch an den PBL. Dort waren nämlich alle CD41/61+ Thrombozyten (Abb. 4.2B, rot) auch IgG-Antikörperpositiv (Abb. 4.2B, doppelt positiv, Überlagerung gelb). Darüber hinaus wiesen > 65% der PBL IgG-Antikörperbindungen (Abb. 4.2B, grün) auf.

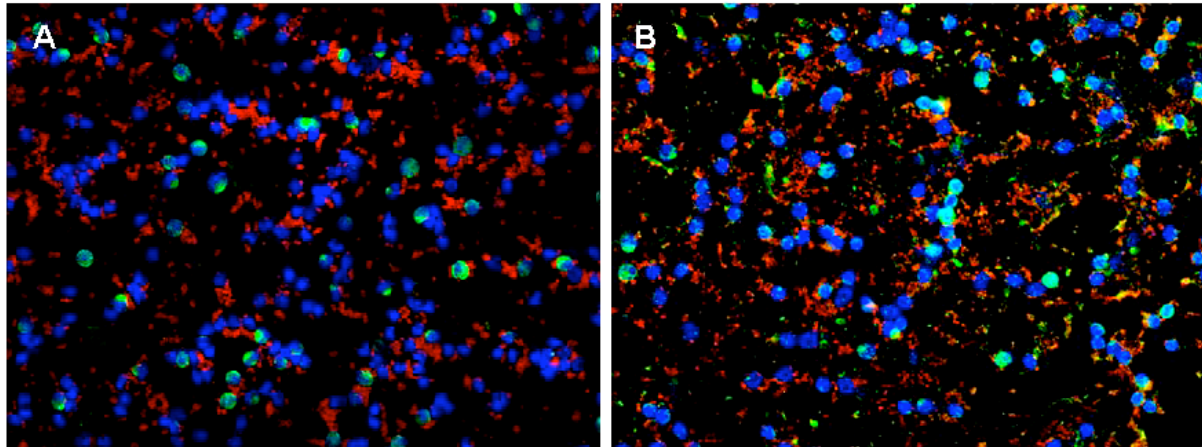


Abb. 4.2: Fluoreszenzdarstellung zur Detektion von Antikörperbindungen aus BNP-Kolostren an Blutzellen gesunder Kälber (ein repräsentatives Beispiel). DAPI gefärbte Zellkerne (blau). Antikörperpositive Zellen (FITC, grün). (A) PBL eines gesunden Kalbes (m, 2 Wochen, SB) inkubiert mit BNP-Kolostrum einer Überträgerkuh (SB, 5 Jahre) und sek. IgM-Antikörper. Ca. 15-20% der PBL waren IgM-Antikörperpositiv (grün). Thrombozyten (CD41/61+:rot) ohne IgM-Antikörperbindungen. (B) PBL eines gesunden Kalbes (m, 2 Wochen, SB) inkubiert mit BNP-Kolostrum einer Überträgerkuh (SB, 5 Jahre) und sek. IgG-Antikörper. Über 65% der PBL IgG-Antikörperpositiv (grün). Alle CD41/61+ Thrombozyten (rot) doppelt positiv (Überlagerung:gelb).

Demzufolge scheinen keine kolostralen alloreaktiven IgM-Antikörper in der Entstehung von BNP involviert zu sein. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden die IgM-Antikörperpositiven Leukozyten beider Versuchsgruppen miteinander verglichen und in Abbildung 4.3 dargestellt.

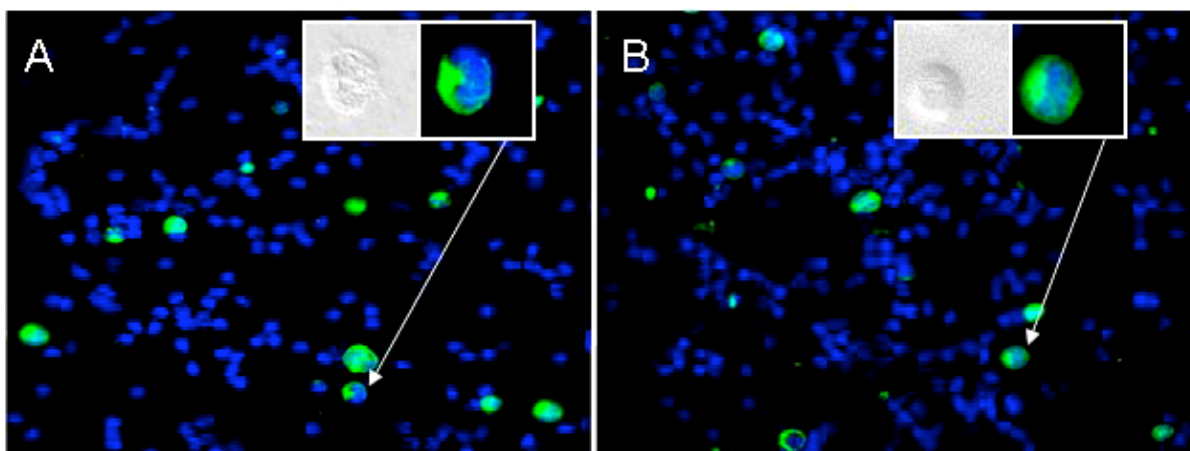


Abb. 4.3: Fluoreszenzdarstellung zum phänotypischen Vergleich der kolostralen IgM-Antikörperbindungen an PBL und Thrombozyten von neonatalen gesunden Kälbern (ein

repräsentatives Beispiel). Kontrollkolostrum (A) und BNP-Kolostrum (B) im direkten Vergleich. IgM-Antikörperpositive Zellen (FITC, grün). DAPI gefärbte Zellkerne (blau). Rechts oben: Vergrößerung einer repräsentativen Antikörperpositiven Zelle im differentiellen Interferenzkontrast (links) und fluoreszierend (rechts). 15% der PBL waren IgM-Antikörperpositiv, sowohl mit Kontroll-Kolostrum (A), als auch mit BNP-Kolostrum (B). Thrombozyten in beiden Versuchsgruppen waren IgM-Antikörpernegativ.

Der Vergleich zwischen Kontroll- (Abb. 4.3A) und BNP-Probe (Abb. 4.3B) zeigte keinerlei phänotypische Unterschiede im Bindungsmuster der kolostralen IgM-Antikörper. Betrachtet man die Leukozyten beider Versuchsreihen, so ergaben sich sowohl mit Kontrollkolostrum (Abb. 4.3A), als auch mit Überträgerproben gleichstarke und vor allem membranständige Signale bei Verwendung eines sekundären anti IgM-Antikörpers (Abb. 4.3A, 4.3B).

Inkubiert man die peripheren Blutleukozyten lediglich mit den sekundären anti-bovinen Ig-Antikörpern (Abb. 4.4), so waren ebenfalls ca. 15% der PBL IgM- (Abb. 4.4A), bzw. IgG-Antikörperpositiv (Abb. 4.4B), was somit die Daten aus allen Kontrollversuchen (Abb. 4.3A, Abb. 4.6A) reflektiert.

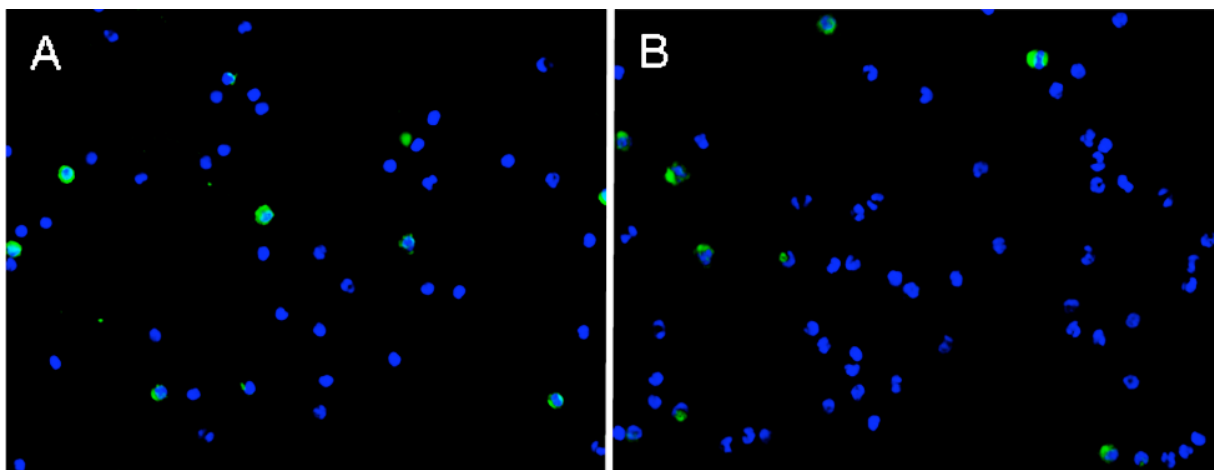


Abb. 4.4: Fluoreszenzdarstellung zum phänotypischen Vergleich der IgM-Antikörperpositiven (A) sowie IgG-Antikörperpositiven (B) Lymphozyten ohne Einsatz kolostraler Ak. (A) PBL eines gesunden Kalbes inkubiert mit sek. anti-bov. IgM-Antikörper. IgM-Antikörperpositive PBL (FITC; grün). DAPI gefärbte Zellkerne (blau). (B) PBL eines gesunden Kalbes inkubiert mit sek. anti-bov. IgG-Antikörper. IgG-Antikörperpositive PBL (FITC, grün). DAPI gefärbte Zellkerne (blau).

Des Weiteren zeigte die statistische Auswertung wiederholter Untersuchungen mit jeweils zehn verschiedenen Kontroll- und BNP-Kolostren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bindungen der IgM-Antikörper. Im Durchschnitt waren in der Kontroll-Gruppe 20% der PBL und in der BNP-Gruppe 16% der PBL mit geringen Abweichungen in der Bindungszahl IgM-Antikörperpositiv (Abb. 4.5).

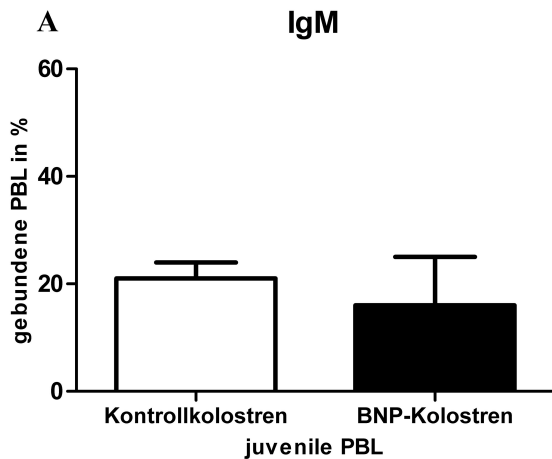


Abb. 4.5: Statistische Auswertung der IgM-Antikörperbindungen an PBL gesunder Kälber. Prozentualer Anteil der positiv gefärbten PBL mit IgM-Antikörpern bei jeweils zehn Kontroll-Kolostren (weißer Balken mit Standardabweichung) und zehn BNP-Kolostren (schwarzer Balken mit Standardabweichung). Für IgM ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Student's *t*-Test $p > 0,05$) zwischen den Kontrollen (20%) und den BNP-Proben (16%).

4.3 Immunphänotypische Charakterisierung der BNP transferierenden Alloantikörper

4.3.1 Identifikation der alloreaktiven IgG-Subklasse

Um die Immunglobulinklasse der kolostralen BNP transferierenden Alloantikörper exakt zu identifizieren, wurden die alloreaktiven Antikörper an Blutzellen neonataler Kälber mittels immunzytochemischer Färbungen immunphänotypisch charakterisiert. Dabei zeigten die Untersuchungen, dass sowohl die Kontrolle, als auch die BNP-Überträger keine Bindungen alloreaktiver Antikörper der Klasse IgG2 (Abb. 4.6A, 4.6B) aufwiesen.

Im Folgenden sind die Antikörperreaktionen der Subklassen IgG2 und IgG1 aus Kontroll- (links) und BNP-Kolostren (rechts) bildlich dargestellt (Abb. 4.6 und Abb. 4.7).

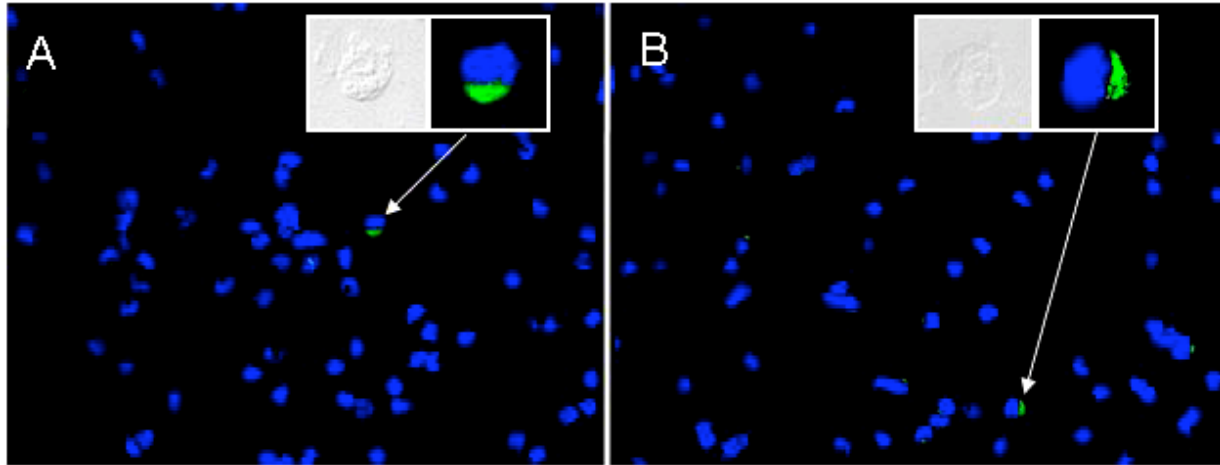


Abb. 4.6: Fluoreszenzdarstellung zur Charakterisierung der kolostralen IgG2-Antikörperbindungen an Blutleukozyten (PBL) und Thrombozyten von neonatalen gesunden Kälbern. Kontroll-Kolostrum (links) und BNP-Kolostrum (rechts). Antikörperpositive Zellen (FITC, grün). DAPI gefärbte Zellkerne (blau). Rechts oben: Vergrößerung einer repräsentativen Antikörper-positiven Zelle im differentiellen Interferenzkontrast (links) und fluoreszierend (grün, rechts). Keine Antikörperbindungen der Klasse IgG2, weder in Kontrolle (A), noch in BNP-Probe (B). Sowohl Thrombozyten als auch PBL IgG2-Antikörpernegativ.

Darüber hinaus wiesen auch die immunzytochemischen Färbungen der Kontroll-Proben mit IgG1 keine Alloreaktivität an den bovinen Zellen auf (Abb. 4.7A). Die etwa 15% der IgG1-Antikörperpositiven Leukozyten reflektieren die Anzahl IgG-Antikörperpositiver Leukozyten aus vorangegangenen Untersuchungen ohne Beteiligung kolostraler Antikörper (Abb. 4.4B).

Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung mit BNP-Kolostren eine intensive Reaktion von IgG1+ Alloantikörpern mit einer deutlichen Bindung an Thrombozyten aber auch an Leukozyten (Abb. 4.7B). Dabei stellten sich bei über 70% der Leukozyten deutlich ausgeprägte Membran- und Zytoplasma-assoziierte Bindungen der IgG1-Alloantikörper dar (Abb. 4.7B, grün).

Um diese Reaktionen besser veranschaulichen zu können, wurde auch hier von jeder Probe (Kontrolle und BNP) ein Bild mit einer repräsentativen Zelle in vergrößerter Optik dargestellt. Abbildung 4.7B zeigt eine IgG1-Antikörperpositive Zelle (grün) mit adhätierenden IgG1-Antikörperpositiven Thrombozytenaggregaten (grün).

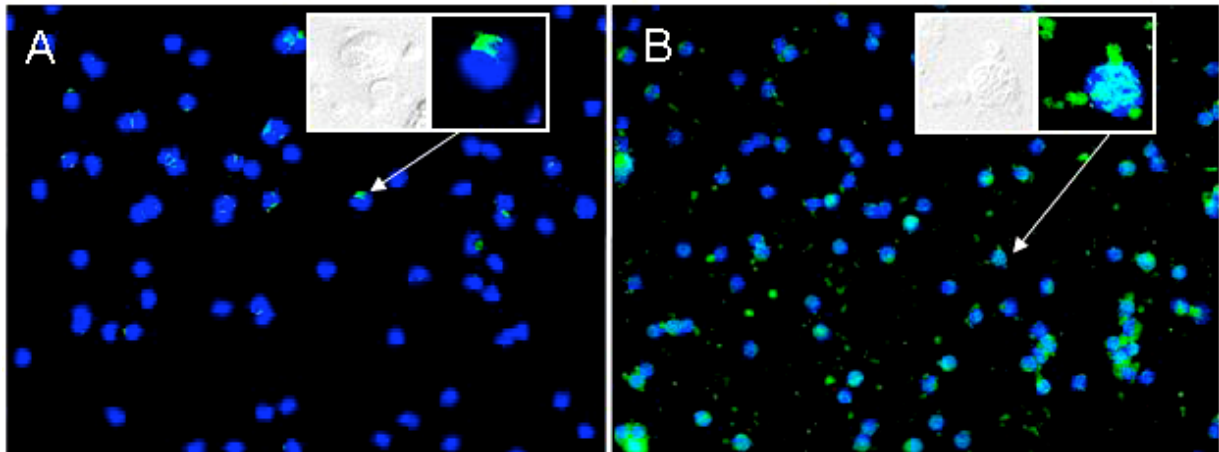


Abb. 4.7: Fluoreszenzdarstellung zur Charakterisierung der kolostralen IgG1-Antikörperbindungen an Blutleukozyten (PBL) und Thrombozyten von neonatalen gesunden Kälbern. Kontroll-Kolostrum (links) und BNP-Kolostrum (rechts). Antikörperpositive Zellen (FITC, grün). DAPI gefärbte Zellkerne (blau). Rechts oben: Vergrößerung einer repräsentativen Antikörper-positiven Zelle im differentiellen Interferenzkontrast (links) und fluoreszierend (grün, rechts). (A) Circa 15% der PBL IgG1-Antikörperpositiv. Die kernlosen Thrombozyten sind FITC negativ. (B) Intensive Antikörperbindungen der Klasse IgG1 mit BNP-Kolostrum an Membran und Zytoplasma von Thrombozyten und Leukozyten.

4.3.2 IgG1-Alloreaktivität an 70% der Leukozyten und 100% der Thrombozyten

Zur Verifizierung und Quantifizierung der kolostralen Antikörperbindungen an bovinen Blutzellen wurden auf gesunden PBL-Proben die Antikörperreaktionen der Immunglobulinklassen IgG1 und IgG2 von zehn BNP-Kolostren mit Kontroll-Kolostren analysiert. Für die quantitative Auswertung wurden alle Antikörperpositiven Leukozyten der ersten 100 gezählten Zellen herangezogen. Die Ergebnisse sind in einem Säulendiagramm dargestellt (Abb. 4.8).

Auch hier wurden keine IgG2-Alloantikörperbindungen erfasst (Abb. 4.8A). Dagegen ergab sich für IgG1 ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Antikörperbindungen der BNP-Kolostren (Abb. 4.8B, schwarzer Balken) und der Kontroll-Kolostren (Abb. 4.8B, weißer Balken). Im Durchschnitt wurden 70% ($\pm 4\%$) Leukozyten und 100% der Thrombozyten von alloreaktiven IgG1-Antikörpern aus den BNP-Proben gebunden (Abb. 4.8B). Diese Resultate konnten darüber hinaus interessanterweise unabhängig von Rasse und Geschlecht der jeweiligen PBL-Spender beobachtet werden. Selbst bei den kolostralen Proben konnten zwischen

der Rasse wie auch dem Alter der Kühe keinerlei Unterschiede in der Anzahl der IgG1-Alloantikörperbindungen erfasst werden.

Demzufolge zeigten die willkürlich gewählten Kombinationen (zwischen Kolostrum und PBL-Donoren) innerhalb beider Versuchsgruppen wiederholt eine ausschließlich hohe Alloreaktivität der kolostralen BNP-IgG1-Antikörper.

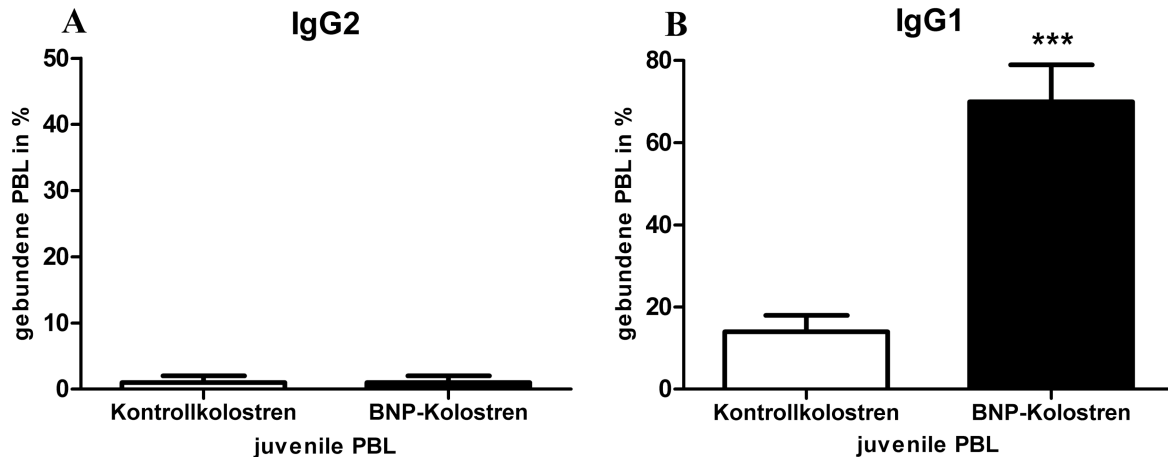


Abb. 4.8: Statistische Auswertung der Antikörperbindungen beider IgG-Klassen an PBL verschieden gesunder Kälber. Prozentualer Anteil der IgG2-Antikörperpositiven PBL (A) und IgG1-Antikörperpositiven PBL (B) aus jeweils zehn Kontroll-Kolostrum (weißer Balken mit Standardabweichung) und zehn BNP-Kolostrum (schwarzer Balken mit Standardabweichung). Für IgG2 (A) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Student's *t*-Test $p > 0,05$) zwischen den Kontrollen (1%) und den BNP-Proben (1%). (B) Die mit *** gekennzeichnete Säule zeigt im Mann-Whitney-Test eine hohe Signifikanz von $p \leq 0,001$. Im Durchschnitt wurden 14% der Leukozyten von Kontroll-IgG1-Antikörpern gebunden (weißer Balken), dagegen 70% der Leukozyten von BNP-IgG1-Antikörpern (schwarzer Balken).

4.4 Ermittlung einer altersabhängigen Veränderung der Zielantigen-expression

BNP wurde vor allem wegen des Kolostrumtransfers bisher nur bei neonatalen Kälbern beobachtet (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass auch ausgewachsene Rinder bei der Übertragung von BNP induzierenden Antikörpern (z.Bsp. über den Bluttransfer) erkranken. Aus dem Grund stand die Charakterisierung des Zielantigens im Vordergrund der folgenden Untersuchungen. Um Aufschluss über eine mögliche altersabhängige Veränderung

der Zielantigenexpression zu erlangen, wurden in dieser Arbeit die BNP-IgG1-Alloantikörper auf ihr Bindungsverhalten an bovinen Blutzellen von unterschiedlich alten Probanden (n=20) untersucht. Möglicherweise exprimieren nur die Blutzellen neonataler Kälber das entsprechende Zielantigen, was im Folgenden untersucht wurde.

4.4.1 Das BNP-Zielantigen bleibt bei der Zellreifung stabil exprimiert

In dieser Studie wurden mittels immunzytochemischer Untersuchungen BNP-IgG1-Alloantikörperbindungen (aus zehn verschiedenen Kolostrumproben) an PBL von jungen (n=15) und erwachsenen (n=5) Rindern unterschiedlicher Rasse (deutsches Fleckvieh, HF, Braunvieh, Kreuzung) und Geschlecht getestet.

Ähnlich wie bei den Versuchen mit PBL neonataler Kälber betrug der Anteil an Kontroll-Antikörperpositiver Leukozyten bei den älteren Tieren ebenfalls zwischen 16-20% (Abb. 4.9A, 4.9B, weißer Balken).

Interessanterweise ergab sich kein signifikanter Unterschied im Bindungsmuster der BNP-IgG1-Alloantikörper zwischen den einzelnen Altersgruppen der Blutspender (Abb. 4.9A, 4.9B, schwarzer Balken). Die Leukozyten der neonatalen und adulten Proben zeigten mit 70% gleich viele IgG1-Antikörperpositive Reaktionen. Auch die Thrombozyten wurden weiterhin zu 100% von IgG1-Alloantikörpern gebunden (Abb. 4.10). Damit steht fest, dass sich das Zielantigen bei der BNP nicht bei der hämatopoetischen Reifung verändert, sondern konstant exprimiert bleibt.

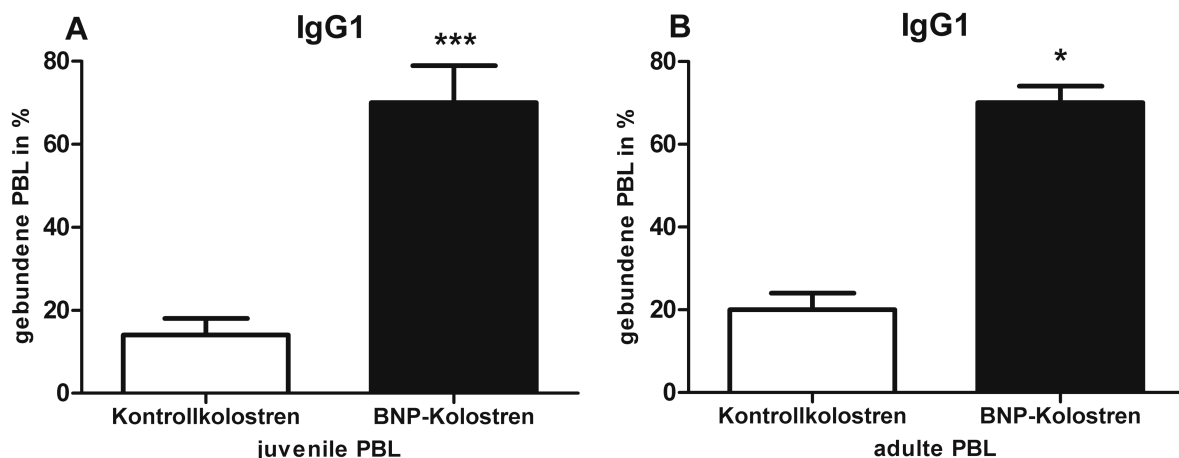


Abb. 4.9: IgG1-Alloantikörperbindungen an gesunden PBL juveniler (A) und adulter (B) Rinder. (A-B) Prozentualer Anteil der IgG1-Antikörperpositiven Leukozyten inkubiert mit jeweils zehn Kontroll-

Kolostren (weißer Balken mit Standardabweichung) und zehn BNP-Kolostren (schwarzer Balken mit Standardabweichung). (A) ***= Der Unterschied der IgG1-Antikörperpositiven PBL juveniler Rinder bei den BNP-Kolostren ist im Mann-Whitney Test mit $p \leq 0,01$ hochsignifikant. (B) Bei den PBL adulter Rinder hat die mit * gekennzeichnete Säule im Mann-Whitney-Test eine Signifikanz von $p < 0,05$. Im Durchschnitt wurden 14% (A) und 20% (B) der Leukozyten von Kontroll-IgG1-Antikörpern gebunden (IgG1-exprimierende B-Zellen). Sowohl bei juvenilen PBL (A), als auch bei adulten PBL (B) binden die IgG1+ Alloantikörper 70% der Leukozyten.

Bei der Analyse des phänotypischen Bindungsmusters der IgG1-Antikörper zeigten sich bei den PBL des jungen Kalbes (Abb. 4.10A), aber auch bei den Zellen adulter Probanden (Abb. 4.10B) membranständige und intrazelluläre Bindungsmuster jener Alloantikörper. Auch die Thrombozyten beider Altersgruppen waren IgG1-Antikörperpositiv (DAB, braun).

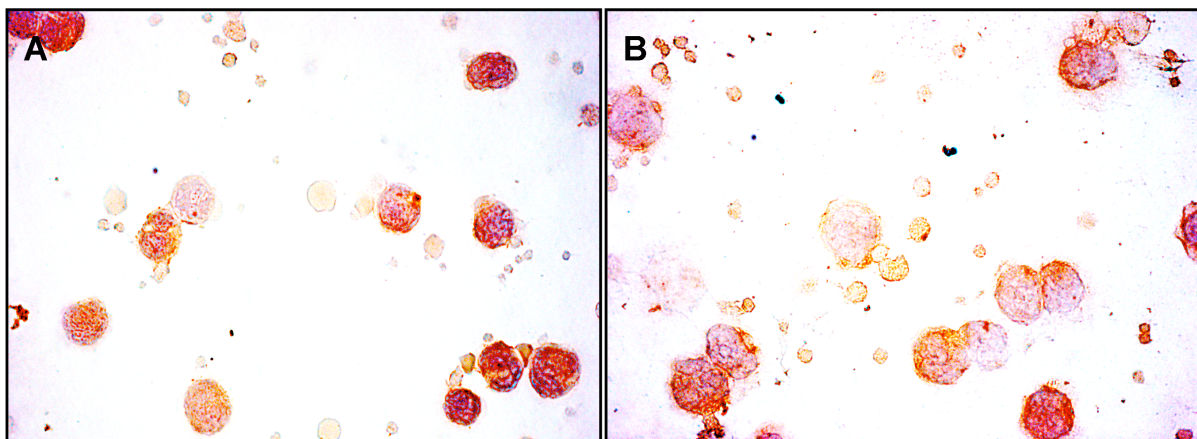


Abb. 4.10: Immunzytochemische Färbung zur Phänotypisierung der Bindungsmuster von BNP-IgG1-Antikörpern an gesunde PBL juveniler (A) und adulter (B) Rinder (ein repräsentatives Beispiel für beide Altersgruppen). Zellkernfärbung (Hämalaun, blau). IgG1-Antikörperpositive Zellen (DAB, braun-rot). 100-fache Optik. (A) PBL eines gesunden Kalbes (weiblich, SB, 1 Woche) inkubiert mit Kolostrum einer BNP-Überträgerkuh (FV, 4,5 Jahre). (B) PBL eines gesunden Rindes (m, FV, >9 Monate) inkubiert mit Kolostrum einer BNP-Überträgerkuh (SB, 6 Jahre). (A-B) Membranständiges Bindungsmuster der IgG1-Alloantikörper an den PBL und Thrombozyten beider Altersgruppen.

4.5 Identifikation und Phänotypisierung der Zielzellen

Die vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeit wiesen eine vermehrte Alloreaktivität der kolostralen BNP-Antikörper der IgG1-Klasse nach. Sowohl

Leukozyten als auch Thrombozyten zeigten dabei intensive IgG1-Antikörperreaktionen (Abb. 4.7B, Abb. 4.10).

Um die Bindungsmuster jener Alloantikörper und deren Zielzellen genauer zu charakterisieren, wurden Doppelfärbungen zur Phänotypisierung der Alloantikörper gebundenen Blutzellen durchgeführt. Die Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen die IgG1-Alloantikörperbindungen an den Zellen der lymphoiden sowie der myeloiden Reihe.

4.5.1 Nur wenig Alloreaktivität der BNP-IgG1-Antikörper an bovinen Blutzellen der lymphoiden Zellreihe

In dieser Versuchsreihe kamen gesunde PBL verschiedener Kälber sowie das mit FITC direkt konjugierte BNP-Kolostrum zum Einsatz um zu klären, ob auch B-Zellen von den Alloantikörpern gebunden werden. Da in den vorigen Versuchen keine alloreaktive Beteiligung von IgM- sowie IgG2-Antikörpern nachgewiesen wurde, können die Antikörperbindungen aus dem direkt mit FITC gekoppelten Kolostrum der IgG1-Klasse zugeordnet werden. Durch diese Methodik erübrigte sich der Einsatz des sekundären anti-bovinen IgG-Antikörpers. Da die Thrombozyten teilweise an den Leukozyten adhären und die Beurteilung der Antikörperbindungen an den Leukozyten und Thrombozyten somit nicht gleichzeitig möglich war, wurden in diesen Untersuchungen PBL-Präparate ohne Thrombozyten verwendet. Mit Hilfe spezifischer CD-Marker wurden die BNP-IgG1-Antikörperreaktionen an B-Zellen (CD21+), zytotoxischen T-Zellen (CD8+) und T-Helferzellen (CD4+) dargestellt und beurteilt.

In allen drei Abbildungen (Abb. 4.11A, 4.11B, 4.11C) entsprechen die IgG1-Alloantikörperpositiven PBL mit etwa 70% der Anzahl der IgG1-Antikörperpositiven Zellen aus den vorigen Untersuchungsreihen (Abb. 4.7B, Abb. 4.8B). Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen konnten mit 12% etwas weniger CD21+ B-Lymphozyten als gewohnt erfasst werden (Abb. 4.11A, rot). Unter physiologischen Bedingungen werden im bovinen Blut ca. 10-20% B-Lymphozyten gemessen (Stöber, 2006), was der Anzahl an Antikörperpositiven Leukozyten aus den vorigen und diesen Untersuchungen in etwa entspricht.

Hier konnte gezeigt werden, dass ca. 75% der CD21+ B-Zellen (Abb. 4.11A, rot) auch IgG1-Antikörperpositiv (grün) waren. Die Zellvergrößerung einer doppelt positiven CD21+ B-Zelle zeigte zudem intensive IgG1-Antikörperreaktionen an der

Membran und im Zytoplasma (Abb. 4.11Ad). Auch die T-Lymphozyten konnten mit Hilfe der spezifischen CD-Marker erfasst werden und entsprachen mit insgesamt 50% (CD8+ und CD4+ T-Zellen zusammengefasst) in etwa den physiologischen Werten (Stöber,2006). Circa 80% der CD8+ T-Zellen (Abb. 4.11B, rot) waren doppelt positiv (gelb). Interessanterweise wiesen viel weniger (< 30%) CD4+ T-Helferzellen (Abb. 4.11C, rot) positive BNP-IgG1-Alloantikörperreaktionen auf (gelb).

Auch hier zeigten die doppelt positiven T-Zellen vor allem membranständige, aber auch Zytoplasma-assoziierte IgG1-Antikörperpositive Reaktionen (Abb. 4.11Bd, 4.11Cd).

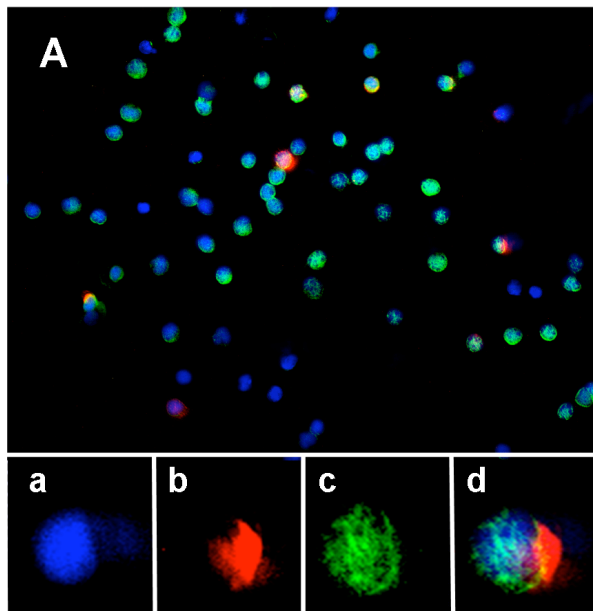


Abb. 4.11: Fluoreszenzdarstellung zur Phänotypisierung der Bindungsmuster von BNP-IgG1-Alloantikörpern an den Blutzellen der lymphoiden Zelllinie. DAPI gefärbte Zellkerne (blau). IgG1-Antikörperpositive Zellen (grün). (A) IgG1-Alloantikörperbindungen (grün) an 75% der B-Zellen (CD21+:rot). (a-d) Vergrößerung von jeweils einer repräsentativen doppelt positiven B-Zelle. (Aa) DAPI gefärbter Zellkern (blau). (Ab) CD21+ B-Zelle (rot). (Ac) IgG1-Antikörperpositive B-Zelle (grün). (Ad) Doppelt positive B-Zelle (Überlagerung gelb/orange)

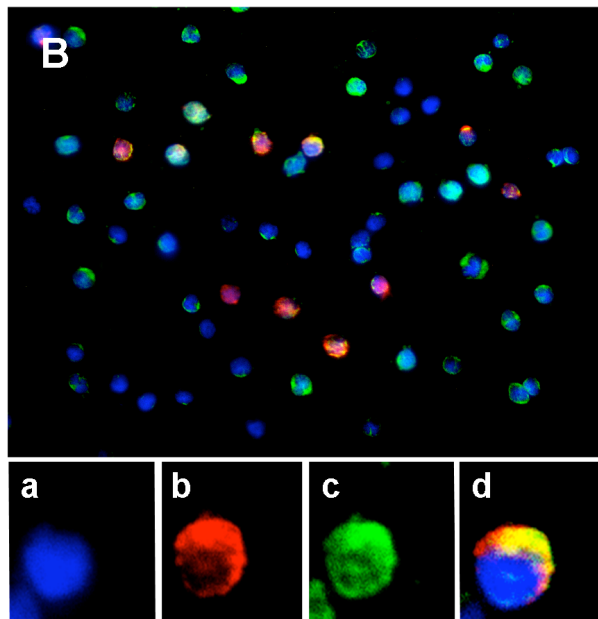


Abb. 4.11: (B) IgG1-Alloantikörperbindungen (grün) an <80% der zytotoxischen T-Zellen (CD8+:rot). (a-d) Vergrößerung von jeweils einer repräsentativen doppelt positiven zytotoxischen T-Zelle. (Ba) DAPI gefärbter Zellkern (blau). (Bb) CD8+ T-Zelle (rot). (Bc) IgG1-Antikörperpositive zytotoxische T-Zelle (grün). (Bd) Doppelt positive zytotoxische T-Zelle (Überlagerung gelb/orange).

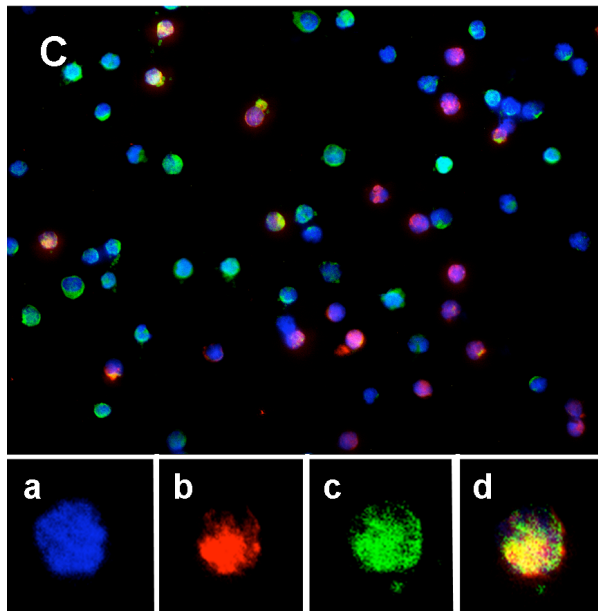


Abb. 4.11: (C) Nur vereinzelte IgG1-Alloantikörperreaktionen (grün) an T-Helferzellen (CD4+:rot). (a-d) Vergrößerung von jeweils einer repräsentativen doppelt positiven T-Helferzelle. (Ca) DAPI gefärbter Zellkern (blau). (Cb) CD4+ T-Helferzelle (rot). (Cc). IgG1-Antikörperpositive T-Helferzelle (grün). (Cd) Doppelt positive T-Helferzelle (Überlagerung gelb/orange).

4.5.2 BNP-IgG1-Alloantikörper binden an 100% der Zellen aus der myeloiden Zellreihe

Auch in dieser Versuchsreihe wurden gesunde PBL verschiedener Kälber sowie das mit FITC konjugierte BNP-Kolostrum verwendet. Für die phänotypische Charakterisierung der Bindungsmuster jener Alloantikörper an die Thrombozyten kamen die thrombozytenhaltigen PBL-Präparate zum Einsatz (Abb. 4.12A). Um die Alloreaktivität an den übrigen Leukozytensubpopulationen ohne Überlagerung der

adhärierenden Thrombozyten besser beurteilen zu können, wurden diese Untersuchungen mit PBL-Präparaten ohne Thrombozyten durchgeführt (Abb. 4.12B, Abb. 4.12C). Die Identifikation der Zielzellen erfolgte mit Hilfe spezifischer CD-Marker für Thrombozyten (CD41/61+), Granulozyten (CD172a+) und Monozyten (CD14+), wobei CD14 zusätzlich auf bovinen Granulozyten exprimiert wird (Ibeagha-Awemu et al., 2008).

Auch hier entsprechen in allen drei Abbildungen (Abb. 4.12A, 4.12B, 4.12C) die IgG1-Alloantikörperpositiven PBL mit etwa >70% der Anzahl gezählter positiver Zellen aus vorigen Versuchen (Abb. 4.7B, Abb. 4.8B).

Wie aus vorangegangenen Untersuchungen bereits erwartet (Abb. 4.2B, Abb. 4.7B), zeigten auch diese Doppelfärbungen, dass alle CD41/61+ Thrombozyten doppelt positiv waren, d.h. BNP-IgG1-Antikörperpositiv (Abb. 4.12A, gelb). In der Zellvergrößerung kann man nicht zwischen Membran- oder/und Zytoplasma-assoziierten Alloantikörperreaktionen bei den Thrombozyten unterscheiden (Abb. 4.12Ad).

Unter physiologischen Bedingungen werden im bovinen Blut ca. 35-40% neutrophile Granulozyten gemessen (Stöber, 2006), was der Anzahl der hier erfassten CD172a+ Granulozyten entspricht. Interessanterweise waren auch 100% der CD172a+ Granulozyten (Abb. 4.12B) und 100% der CD14+ Monozyten (Abb. 4.13C) BNP-IgG1-Antikörperpositiv (Überlagerung gelb). Dabei wiesen sowohl die Granulozyten, als auch die Monozyten intensive Membran- und auch Zytoplasma-assoziierte IgG1-Alloantikörperreaktionen auf (Abb. 4.12Bd, Abb. 4.12Cd). Den Ergebnissen aus Abb. 4.11 zu Folge sind die Leukozyten, die nicht oder nur vereinzelt von IgG1-Antikörpern gebunden waren (Abb. 4.12B, Abb. 4.12C, grün) den Zellen der lymphoiden Reihe zuzuordnen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Zielantigen auf allen Zellen der myeloiden Reihe und nur auf Subpopulationen von CD8+ T-Zellen und CD21+ B-Zellen aus der lymphoiden Zellreihe durchgehend exprimiert ist. CD4+ T-Zellen wiesen dagegen nur vereinzelt Alloantikörperbindungen auf.

Darüber hinaus konnten nicht nur auf der Membran sondern auch im Zytoplasma jener Zellen positive Alloantikörperreaktionen erfasst werden.

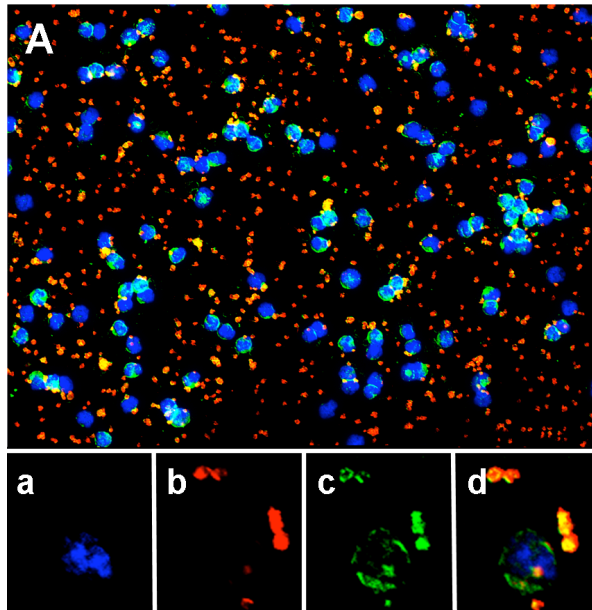


Abb. 4.12: Fluoreszenzdarstellung zur Phänotypisierung der Bindungsmuster von BNP-IgG1-Alloantikörpern an den myeloiden Zellen. DAPI gefärbte Zellkerne (blau.). IgG1-Alloantikörperpositive Zellen (grün). (A) IgG1-Alloantikörperbindungen (grün) an 100% Thrombozyten (CD41/61+:rot). Alle Thrombozyten sind doppelt positiv (orange/gelb). (a-d): Vergrößerung von jeweils einem repräsentativen doppelt positiven Thrombozyten. (Aa) DAPI gefärbter Zellkern einer PBL-Zelle (blau). (Ab) CD41/61+ Thrombozyten (rot). (Ac) IgG1-Antikörperpositive Thrombozyten und PBL (grün). (Ad) doppelt positive Thrombozyten (Überlagerung gelb/orange).

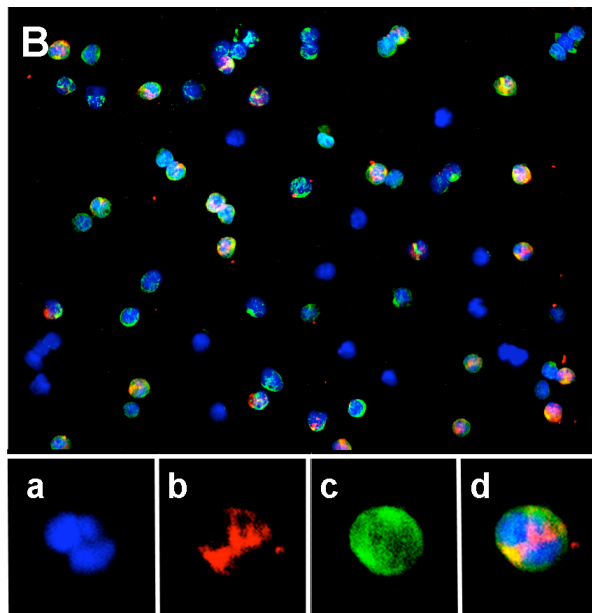


Abb. 4.12: (B) IgG1-Alloantikörperbindungen (grün) an 100% Granulozyten (CD172a+:rot). (a-d): Vergrößerung von jeweils einem repräsentativen doppelt positiven Granulozyten. (Ba) DAPI gefärbter Zellkern (blau). (Bb) CD172a+ Granulozyt (rot). (Bc) IgG1-Antikörperpositiver Granulozyt (grün). (Bd) doppelt positiver Granulozyt (Überlagerung gelb/orange).

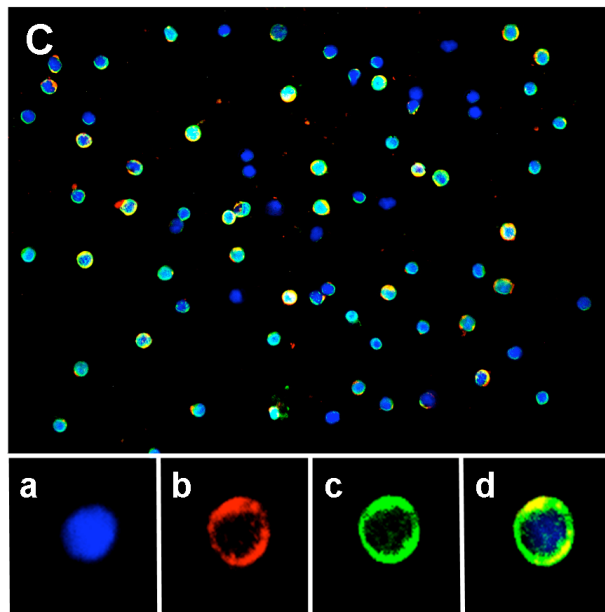


Abb. 4.12: (C) IgG-Alloantikörperreaktionen (grün) an 100% Monozyten (CD14+:rot). (a-d): Vergrößerung von jeweils einem repräsentativen doppelt positiven Monozyt. (Ca) DAPI gefärbter Zellkern (blau). (Cb) CD14+ Monozyt (rot). (Cc) IgG1-Antikörperpositiver Monozyt. (grün). (Cd) doppelt positiver Monozyt (Überlagerung gelb/orange).

5 DISKUSSION

Aufzeichnungen über die bovine neonatale Panzytopenie (BNP) gibt es in Europa (außer Schweiz, Österreich und Dänemark) seit 2007 mit rasch steigender Inzidenz (Friedrich et al.,2009; Pardon et al.,2009). Die Prävalenz der Erkrankung wird jedoch mit 0,3% sehr niedrig geschätzt und erreicht vermutlich knapp 10% innerhalb einer Herde (Foucras et al.,2011). Deshalb lässt sich die Entstehung von BNP aufgrund der Komplexität der Erkrankung und ihrer Ätiologie nur schwierig voraussagen und sorgt vor allem unter den betroffenen Landwirten für Besorgnis. Obwohl die wirtschaftlichen Verluste diesen Zahlen zu Folge keine überdimensionalen Ausmaße erreichen (Foucras et al.,2011), bedarf es jedoch weiterer Aufklärung zum Verständnis der bis zu 95% tödlich verlaufenden Erkrankung.

Bis heute ist die genaue Ätiologie und Pathogenese von BNP nicht vollständig geklärt und wirft noch einige Fragen auf (Bastian et al.,2011; Bridger et al.,2011). Untersuchungen auf infektiöse, toxische oder genetische Zusammenhänge mit der Erkrankung lieferten bisher nur negative Ergebnisse (Pardon et al.,2009; Kappe et al.,2010; Krappmann et al.,2011). Epidemiologische Studien ergaben eine Gemeinsamkeit hinsichtlich der BVD-Impfung in den betroffenen Betrieben, bei denen derselbe inaktivierte Impfstoff eingesetzt wurde (Friedrich et al.,2009; Pardon et al.,2009). Schon frühzeitig resultierte daraus der Verdacht eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen BNP und dem Impfstoff Pregsure BVD. BNP ist darüber hinaus mit der Aufnahme von Kolostrum assoziiert (Friedrich et al.,2011; Schroter et al.,2011). Da selbst gefrorenes Kolostrum (-20° C) noch intakte Immunglobuline enthält (Holloway et al.,2001), deuteten die Erkenntnisse auf eine Antikörper-vermittelte Ätiologie für BNP hin (Friedrich et al.,2011; Schroter et al.,2011).

In anderen Studien wurde bisher nur das Serum der Überträgerkühe auf die Anwesenheit und Bindung der darin enthaltenen Antikörper an Zellmembranen von Kälberleukozyten untersucht, woraufhin ein Zusammenhang der Entstehung mit maternalen Alloantikörpern diskutiert wurde (Pardon et al.,2010; Bridger et al.,2011). Obwohl aber das Kolostrum eine primäre Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt, existierten bislang keine Untersuchungen auf immunologischer Basis.

Aus diesem Grund stand bei vorliegender Arbeit die immunphänotypische Charakterisierung der BNP transferierenden Alloantikörper im Kolostrum im

Vordergrund. Die Identifizierung der Subklassen jener verantwortlichen Alloantikörper sollte zudem einen wertvollen Beitrag zur Klärung der BNP-Pathogenese liefern.

Die Analyse der bindenden Antikörper wurde mittels immunzytochemischer Färbungen mit einer gleichgroßen Anzahl von Kolostrum negativer Kontrollkühe und BNP transferierender Kühe an bovinen Leukozyten und erstmalig an Thrombozyten von gesunden, neonatalen sowie adulten Probanden durchgeführt. Da IgM hauptsächlich im Kolostrum neu synthetisiert wird (Lascelles,1979) und somit auch bei der Entstehung von BNP involviert sein könnte, stand die Charakterisierung der Rolle beider Immunglobulinklassen, IgG und IgM, im Fokus dieser Arbeit. Das bovine Kolostrum zeichnet sich neben dem hohen Immunglobulingehalt auch durch einen hohen Gehalt an Fett und anderen Bestandteilen aus (Foley and Otterby,1978), weshalb die Kolostrumverdünnung für die Immunzytochemie im Vergleich zu den herkömmlichen Antikörpern relativ hoch angesetzt werden musste. Bisher existierte jedoch noch kein Protokoll über den Einsatz von bovinem Kolostrum in der Immunzytochemie und folglich auch noch keine Konzentrationsangaben. Aus diesem Grund wurde in vorliegender Arbeit zunächst eine Verdünnungsreihe beider Kolostrum-Gruppen (Kontrolle und BNP-Überträger) angefertigt und eine Titrationskurve (Abb. 4.1) angelegt. Für die Ermittlung der Antikörperreaktionen auf bovinen Blutzellen wurde schließlich eine Kolostrumverdünnung von 1:10.000 für den Nachweis der IgM- (Abb. 4.1A) und IgG-Antikörper (Abb. 4.1B) als Konzentrationsstandard festgelegt.

In dieser Studie wurde erstmalig bewiesen, dass die Antikörper aus BNP-Überträgerkolostrum, die an bovine Thrombozyten und auch periphere Blutleukozyten (Abb. 4.2B, Abb. 4.7B, Abb. 4.8B) binden, ausschließlich vom IgG1-Isotyp sind (Abb. 4.7B, Abb. 4.8B).

Zunächst fielen aber in den Kontrollversuchen ebenfalls positive Antikörperreaktionen auf (Abb. 4.3A, 4.5A, 4.6A, 4.7A), welche –wie sich im späteren Verlauf herausstellte– die Anzahl der IgM- aber auch IgG-exprimierenden B-Zellen reflektierten (Reth,1992; Fuentes-Panana et al.,2004). Wurden die PBL gesunder Kälber lediglich mit sekundären anti-bovinen IgM- (Abb. 4.4A) oder IgG-Antikörpern (Abb. 4.4B) ohne Zusatz von Kolostrum versetzt, so wurden auch hier ca. 15% der PBL von den entsprechenden sekundären Antikörpern gebunden (Abb. 4.4).

Demnach lassen sich die zusätzlichen Antikörperreaktionen in den Kontrollversuchen (Abb. 4.3A, 4.5A, 4.6A, 4.7A) durch die entsprechend eingesetzten sekundären anti-bovinen Ig-Antikörper erklären, die direkt an die IgG- und IgM-exprimierenden B-Zellen (Reth,1992; Fuentes-Panana et al.,2004) gebunden haben. Unter physiologischen Bedingungen werden zudem im bovinen Blut ca. 10-20% B-Lymphozyten gemessen (Stöber,2006), was somit der Anzahl der gezählten Antikörperpositiven Leukozyten aus unseren Untersuchungen in etwa entspricht (Abb. 4.4, Abb. 4.5. Abb. 4.8). Demzufolge konnte auch kein signifikanter Unterschied der IgM- und IgG2-Antikörperreaktionen zwischen Kontroll- und BNP-Überträgerprobe gezeigt werden (Abb. 4.5, Abb. 4.8A), was gegen eine Beteiligung alloreaktiver IgM- und IgG2-Antikörpern bei der BNP-Entstehung spricht. Um auch einen Überblick über die tatsächlichen BNP-IgG1-Antikörperbindungen an B-Lymphozyten zu erhalten, mussten demnach jene überflüssigen B-Zellreaktionen blockiert werden. Durch die direkte Konjugation eines BNP-Kolostrums mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) nach der Methode von Andreas Radbruch (2000) entfiel der Einsatz der sekundären anti-bovinen Ig-Antikörper und damit die direkten Bindungen des sekundären Antikörpers an die B-Lymphozyten (Abb. 4.11, Abb. 4.12). Da in den vorangegangenen Untersuchungen keine Alloreaktivität von IgM- oder IgG2-Antikörpern nachgewiesen wurde, kann man also davon ausgehen, dass die erfassten Antikörperbindungen aus dem direkt mit FITC gekoppelten Kolostrum ausschließlich der Immunglobulinklasse IgG1 zuzuordnen sind.

Unsere Daten sprechen also deutlich dafür, dass die BNP induzierenden Antikörper weder der Immunglobulinklasse IgG2 noch der IgM-Subklasse angehören (Abb. 4.2A, Abb. 4.3, Abb. 4.5, Abb. 4.6, Abb. 4.8A). Zudem stammten die in dieser Studie verwendeten Überträgerkolostren fast ausschließlich von Kühen, die mehr als nur einmal Kälber gebaren, die an BNP erkrankten. Da aber IgM-Antikörper die Erstantwort generieren und auf wiederholtem Antigenkontakt in der Regel ein Klassenwechsel zur Synthese von IgG-Antikörpern erzielt wird (Fellah et al.,1992; Fuentes-Panana et al.,2004), ist es umso wahrscheinlicher, dass die BNP transferierenden Antikörper der Immunglobulinklasse IgG angehören.

IgG1 bildet mit etwa 90% den Hauptteil der im Kolostrum vorkommenden Immunglobuline (Butler,1973). Das bovine Kolostrum besteht hauptsächlich aus den Immunglobulinen, die aus dem Blut der Mutterkuh entstammen (Lascelles,1979).

Während kleine Mengen an IgG2, IgM und IgA direkt in den Plasmazellen der Milchdrüse produziert werden (Lascelles,1979), gelangt IgG1 über spezifische Fc-Rezeptoren, die auch auf den Darmepithelzellen des Kalbes in den ersten 24 Stunden exprimiert werden (Mayer et al.,2005), aktiv in die Milchdrüse und wird im Kolostrum auf ein Vielfaches konzentriert (Smith et al.,1971; Porter,1973; Sasaki et al.,1976). Dabei wirkt der Fc-Rezeptor, verglichen mit IgG2, nur für die IgG1-Antikörper selektiv (Smith et al.,1971; Lascelles,1979). Eine lokal in der Milchdrüse bedingte Bildung pathogener IgG1-Antikörper kann folglich für die Entstehung von BNP ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde kürzlich erwiesen, dass IgG-Antikörper aus Seren von BNP-Überträgerkühen gegen bovine Leukozyten gerichtet sind (Pardon et al.,2010; Bridger et al.,2011). Des Weiteren konnte BNP über die Injektion IgG-Antikörper aus dem Serum von Pregnant BVD-geimpften Kühen auf gesunde Kälber induziert werden (Foucras et al.,2011). Diese Beobachtungen sowie unsere Daten sprechen eindeutig dafür, dass die kolostralen BNP transferierenden IgG-Antikörper mit jenen aus dem Blutserum identisch sind. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse klar, dass IgG1-Antikörper die zentrale Rolle im Pathomechanismus der BNP spielen.

Die Tatsache, dass Kälber nicht nur über die Aufnahme von Kolostrum, sondern auch über die Injektion von Blutserum an BNP erkranken können, sollte auch in Bezug auf Bluttransfusionen, die in der Rindermedizin zu therapeutischen Zwecken angewendet werden (Wujanz,1979), berücksichtigt werden. Demzufolge könnten ausgewachsene Rinder ebenfalls bei der Übertragung jener Antikörper erkranken, auch wenn die Krankheit wegen des Kolostrumtransfers bisher nur bei neonatalen Kälbern beobachtet wurde (Pubmed Recherche Stand März 2012).

Um mehr Informationen über die Eigenschaften des Zielantigens und mögliche altersabhängige Veränderungen der Antigenexpression zu erlangen, haben wir BNP-IgG1-Antikörperbindungen an bovinen Blutzellen von unterschiedlich alten Probanden untersucht. Die neutrophilen Granulozyten des Menschen durchwandern verschiedene Expressionsmuster während des Reifungsprozesses (Elghetany,2002), wobei über eine altersabhängige Veränderung der Antigenexpression auf bovinen Granulozyten bisher keine Literatur existiert (Pubmed Recherche Stand März 2012). Es ist jedoch bekannt, dass die B-Lymphozyten von neonatalen Kälbern weniger CD32 als diejenigen ausgewachsener Rinder exprimieren, während CD21 bei beiden Altersgruppen Expressionsmuster gleicher Intensität aufweist (Chattha et al.,2009,

2010). Diese altersabhängige Variation wirkt sich dementsprechend limitierend auf die immunologischen Funktionen der neonatalen B-Lymphozyten im Zuge der Immunreaktion nach Impfungen aus (Firth et al., 2005). Eine altersabhängige Veränderung der Antigenexpression dieser Art könnte eine mögliche Erklärung für das Auftreten von BNP an ausschließlich neonatalen Kälbern sein. Überraschenderweise trat aber kein signifikanter Unterschied bei den IgG1-Antikörperbindungen zwischen Blutzellen von juvenilen und adulten Probanden verschiedener Rassen und Geschlechter auf (Abb. 4.8, Abb. 4.9). Die willkürlich gewählten Kombinationen zwischen Kolostrum und PBL-Spender innerhalb beider Versuchsgruppen wiesen gleichermaßen intensive IgG1-Antikörperreaktionen sowohl an Leukozyten, als auch an Thrombozyten auf (Abb. 4.9, Abb. 4.10). Damit steht fest, dass sich das Zielantigen bei der BNP nicht bei der hämatopoetischen Reifung verändert, sondern konstant exprimiert bleibt. Darüber hinaus ist die Expression des Zielantigens sowohl rassen- also auch geschlechtsunspezifisch. Ein Tränkeversuch, in dem sechs neugeborene Kälber (unterschiedlicher Rassen) aus bisher unauffälligen Kühen aufgetaute Kolostren von verschiedenen BNP-Überträgerkühen (ebenfalls unterschiedlicher Rassen) erhielten, zeigte ein vergleichbares Verhalten der Krankheitsentstehung (Friedrich et al., 2011). Die in unserer Studie nach ihrer Rasse und Geschlecht zufällig ausgewählten PBL-Spender exprimieren offensichtlich alle das BNP-Antigen, weshalb bei jedem der Probanden, mit geringer Abweichung der Bindungsanzahl, IgG1-Antikörperreaktionen erfasst wurden (Abb. 4.9A, Abb. 4.9B). Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass das Zielantigen ein konstantes Expressionsmuster aufweist und nicht nur auf die Zellen neonataler Kälber beschränkt ist. Daher könnten auch die BNP-Überträgerkühe das entsprechende Zielantigen exprimieren und erkranken.

Nachdem diese Kühe aber selbst keine (sub)klinischen Merkmale zeigen, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der BNP eher um eine Alloimmunerkrankung als um eine Autoimmunreaktion handelt und die BNP-Überträgerkühe das Antigen selbst nicht exprimieren. Um diese Hypothese endgültig zu beweisen, bedarf es einer weiteren Analyse, bei der Alloantikörperbindungen von BNP-Kolostren auf Blutzellen entsprechender BNP-Überträgerkühe getestet werden. Handelt es sich um Alloantikörper, dann müssten die Ergebnisse zur Bestätigung negativ ausfallen.

Interessanterweise geht BNP mit ähnlichen pathophysiologischen Merkmalen wie die fetale alloimmune Thrombozytopenie und Leukozytopenie des Menschen (FAIT)

einher (Gramatges et al.,2009). Die FAIT entsteht mit der Bildung maternalen Alloantikörper, die gegen spezifische Thrombozyten- und Leukozytenantigene paternalen Ursprungs gerichtet sind (Kaplan,2006; Gramatges et al.,2009). Diese Kenntnisse lassen einen ähnlichen Pathomechanismus bei BNP vermuten, bei der die BNP-Überträgerkühe entsprechende Zielantigene (BNP-Antigene) als fremd erkennen und daraufhin die Produktion allereaktiver IgG1-Antikörper generieren. Anders als beim Menschen können bovine Immunglobuline nicht diaplazentar transferiert werden (Kruse,1983), woraufhin die Entstehung von BNP erst mit der Aufnahme von kolostralen antithrombozytären und antileukozytären IgG1-Alloantikörpern erfolgen kann, wenn das Kalb das Kolostrum aufnimmt.

Bei der FAIT werden vor allem im Blutserum der Mütter erhöhte IgG1- sowie IgG3-Antikörpertiter spezifisch gegen das allotypische HPA-3a Antigen, welches von den Thrombozyten exprimiert wird, gemessen (Proulx et al.,1994; Bakchoul et al.,2011). Auch wenn zunächst gewisse Parallelen bezüglich einer isotypspezifischen Alloantikörperproduktion zwischen der BNP und der FAIT bestehen, so unterscheiden sich die bovinen und humanen IgG1-Antikörper erheblich voneinander. Die Nomenklatur der IgG-Isotypen ist lediglich vom Zeitpunkt der Entdeckung sowie deren relativen Konzentration abhängig und nicht von den funktionellen Eigenschaften der Subklassen (Corbeil et al.,1997).

Bisher ist nur wenig über die pathogene Wirkung der BNP transferierenden Antikörper erforscht. Eine gesteigerte Aktivität der Makrophagen auf die Zugabe von Blutzellen, die zuvor mit BNP-Überträgerseren inkubiert wurden, deutete auf eine Phagozytose der BNP-Antikörper gebundenen Leukozyten hin (Bastian et al.,2011). Allerdings wird beim Rind beiden IgG-Isotypen eine komplementaktivierende und neutralisierende, weniger aber eine Makrophagen aktivierende Funktion zugesprochen (McGuire et al.,1979; McGuire and Musoke,1981). Bei der humanen FAIT kommt es zu einer Antikörper-vermittelten Aktivierung des Komplementsystems, woraufhin die Thrombozyten des Fetus geschädigt werden (Proulx et al.,1994; Bakchoul et al.,2011). Sowohl IgG1, als auch IgG3 des Menschen können die Komplementkaskade aktivieren (Abbas et al.,1996). Bei der FAIT fiel jedoch auf, dass die Konzentrationen der anfallenden IgG3-Alloantikörper in Relation zu den entsprechenden Patienten mit hochgradiger Symptomatik sogar signifikant höher waren, als die IgG1-Alloantikörperkonzentrationen in Seren von Patienten mit milderer bis keinen Symptomen (Mawas et al.,1997). Für die

Unterschiede in der Pathogenität von Antikörper-Isotypen gibt es weitere Beispiele bei anderen Erkrankungen. Vergleicht man die Immunreaktionen bei Patienten mit autoimmuner Kardiomyopathie (KMP) mit denen gesunder Probanden, so weisen die KMP-Patienten eine vorherrschende IgG3-Autoantikörperreaktion gegen das Myosin auf (Skylouriotis et al.,1999). IgG1-Antikörper spielen für die Krankheitsentstehung eine untergeordnete Rolle. Dagegen bilden die gesunden Probanden keine IgG3-Autoantikörper, weshalb sie folglich auch nicht an autoimmuner Kardiomyopathie erkranken (Skylouriotis et al.,1999).

Im bovinen Blut werden in der Regel mit 9-11 g/l gleiche Werte an IgG1- und IgG2-Antikörpern gemessen (Butler and Brown,1994), wobei unsere Ergebnisse klar zeigen, dass es sich bei der BNP um eine ausschließlich IgG1-vermittelte Alloimmunerkrankung handelt, wie sie bislang noch nicht bei Rindern beobachtet wurde. Um die Synthese pathogen wirkender isotypspezifischer Alloantikörper zu verstehen, bedarf es zunächst eines Einblicks in die physiologischen Gegebenheiten des Immunsystems mit Bildung protektiver Antikörper.

Die Synthese der IgG-Isotypen hängt vor allem von der Fähigkeit des Immunsystems ab, über verschiedene Mechanismen von Immunreaktionen zu verfügen (Abbas et al.,1996). Mosmann et al. (1986) stellten ein Tiermodell für die verschiedenen Immunantworten (Th1/Th2) bei Mäusen auf, um die Abwehrreaktionen infolge Infektionen mit verschiedenen Pathogenen beim Menschen besser verstehen zu können. Die zellvermittelte Abwehr des erworbenen Immunsystems erfolgt überwiegend über die Aktivierung von CD4+ T-Lymphozyten, den T-Helferzellen (Abbas et al.,1996). Bestimmte Antigene generieren die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, die für diese Antigene spezifisch sind (Abbas et al.,1996). Ausgehend von ihrer Aktivierung und der folgenden Immunreaktion unterschied man zwei T-Helferzelltypen, die Th1- und die Th2-Zellen (Mosmann and Coffman,1989). Für aktivierte Th1-Zellen ist die Ausschüttung von Zytokinen wie IFN- γ (Interferon-gamma), IL-2 (Interleukin-2) und TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) charakteristisch, durch die eine zellvermittelte Typ1-Immunreaktion (cell mediated immune response, CMIR) induziert wird (Bottomly,1988; Mosmann and Coffman,1989). Das IFN- γ stimuliert nach Freisetzung die B-Zell-vermittelte Produktion von komplementbindenden IgG-Antikörpern, beim Menschen vor allem der Subklassen IgG1 und IgG3, bei der Maus die Isotypen IgG2a und IgG3 (Snapper and Paul,1987; Stevens et al.,1988; Abbas et al.,1996). Eine vorherrschende Th1-

abhängige Immunantwort kann man nicht nur nach Infektionen beobachten, sondern auch bei Autoimmunerkrankungen sowie alloreaktiven Transfusionserkrankungen (Abbas et al.,1996; Goker et al.,2001; Kidd,2003). Klinisch von Bedeutung ist in der Humanmedizin die autoimmunbedingte Kardiomyopathie, die mit der Th1-dominierenden Bildung von IgG1- aber vor allem von den pathogen wirkenden IgG3-Autoantikörpern gegen Myosin einhergeht (Skylouriotis et al.,1999). Bei der FAIT des Menschen handelt es sich ebenfalls um eine Th1-Zell-vermittelte Immunreaktion mit Bildung pathogener IgG-Alloantikörper, ausschließlich der IgG3-Subklasse (Proulx et al.,1994). Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnte der BNP auch einer Th1-Zell-abhängigen Alloantikörperreaktion gegen entsprechende Zielantigene zu Grunde liegen. Allerdings ist beim Rind das Th1-Zell-vermittelte IFN- γ für eine IgG2-Synthese verantwortlich (Estes et al.,1994).

Neben der zellabhängigen Immunantwort der Th1-Zellen kann das Immunsystem auch eine Antikörper-vermittelte Immunreaktion (antibody mediated immune response, AMIR) einleiten (Abbas et al.,1996). Die Th2-Zellen (Typ2-Immunantwort) setzen dabei die Zytokine Interleukine-4 und -5 (IL-4, IL-5) frei, die eine entscheidende Rolle bei der Produktion von nicht komplementbindenden IgG4-Antikörpern des Menschen spielen (Mosmann and Coffman,1989), welche den IgG1-Antikörpern der Maus homolog sind (Coffman et al.,1993). Die Th2-abhängige Aktivierung von IL-4 reguliert beim Rind dagegen die Antikörperproduktion von IgE sowie den neutralisierend wirkenden IgG1 -Antikörpern (Estes et al.,1995).

Die Typ1-Antwort soll vor allem die Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren und Bakterien stimulieren (Abbas et al.,1996), während die Typ2-Antwort für die Abwehr von extrazellulären Keimen, wie z.B. Parasiten, verantwortlich ist (Kidd,2003). Dieses streng gehaltene Modell hält das Immunsystem sowohl nach natürlicher Infektion als auch infolge einer Impfung (u.a. das bovine Immunsystem) nicht ein, nachdem bei Rindern IgG1 und IgG2 gleichermaßen als sehr wichtige Teilnehmer an der Abwehr extrazellulärer und intrazellulärer Pathogene beteiligt sind (Corbeil,2002; Welsh et al.,2005). Zum Beispiel stimulieren *Babesia bigema*-spezifische CD4+ T-Zellen eine erhöhte Produktion von IgG1- und IgG2-Antikörpern, während *Fasciola hepatica*-spezifische T-Zellklone nur die Synthese von IgG1-Antikörpern generieren (Brown et al.,1999). Impfstudien mit DNA-Vakzinen beschrieben ebenfalls eine Th2-dominierte Immunantwort mit Bildung von IgG1-Antikörpern (Arulkanthan et al.,1999; Brown et al.,1999). Die Immunisierung von

Rindern mit einem inaktivierten Kombinationsimpfstoff gegen das Bovine Respiratorische Synzytial Virus (BRSV) und gegen *Histophilus somni* resultierte in einer erhöhten Produktion Th2-abhängiger IgG1-Antikörper gegen das BRSV, während gegen *H. somni* eine Th1-vermittelte Synthese protektiver IgG2-Antikörper gemessen wurde (Corbeil et al.,1997; Berghaus et al.,2006). Ähnlich verhält sich die natürliche Infektion des Rindes mit BVDV, wobei auch hier Antikörper beider IgG-Subklassen gleichermaßen gebildet werden und neutralisierend gegen die zytopathogenen oder nicht zytopathogenen Virusstämme wirken (Howard,1990). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass BNP-Überträgerkühe eine Th2-abhängige Immunreaktion ausgebildet haben, wobei die Synthese alloreaktiver IgG1-Antikörper mit pathogenen Nebenwirkungen stimuliert wurde. Die Ursache für eine isotypspezifische Alloimmunreaktion solchen Ausmaßes ist weitgehend ungeklärt und bedarf weiterer Forschung.

Nicht nur die Genetik des Tieres (Heriazon et al.,2011), sondern auch die Antigendosis sowie das eingesetzte Adjuvans im Impfstoff sollen die isotypspezifischen Immunreaktionen und deren gewünschte Funktionen stark beeinflussen (Moingeon et al.,2001). Im Laufe der Aufzeichnungen über BNP wurde eine Gemeinsamkeit hinsichtlich der BVD-Impfung in den betroffenen Betrieben festgestellt, in denen derselbe inaktivierte Impfstoff (Pregsure BVD) eingesetzt wurde (Friedrich et al.,2009; Pardon et al.,2009). Schon frühzeitig resultierte daraus der Verdacht eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen BNP und Pregsure BVD, der zudem durch die Rücknahme der Zulassung des Impfstoffes bestärkt wurde (PEI,2011). Die Immunisierung von Kühen mit Pregsure BVD resultierte darüber hinaus in einer erhöhten Produktion von Alloantikörpern, die an Kälberleukozyten gebunden haben (Bastian et al.,2011).

In dieser Arbeit konnten erstmalig BNP-IgG1-Alloantikörperreaktionen aus Kolostren von Pregsure BVD-geimpften Kühen, deren Kälber vorberichtlich an BNP erkrankt waren, nachgewiesen werden (Abb. 4.2B, Abb. 4.7B, Abb. 4.8B). Andererseits fielen die Untersuchungen mit Kolostren von drei weiteren Pregsure BVD-geimpften Kühen, deren Kälber klinisch unauffällig waren, in dieser Arbeit negativ aus (Abb. 4.8B, Kontrollbalken). Demzufolge muss die Immunisierung mit Pregsure BVD nicht zwingend bei jeder geimpften Kuh mit der Produktion pathogener Alloantikörper und daraus resultierender BNP-Entstehung einhergehen, was an der Ausstattung der entsprechenden Kühe mit dem Zielantigen liegen könnte.

Zwischen 1963 und 1969 wurde schon einmal ein ähnliches Auftreten einer Alloimmunerkrankung bei insgesamt 35 neugeborenen Kälbern von 21 Kühen beobachtet, die auch durch eine Muttertierimpfung, nämlich der gegen die bovine Babesiose, ausgelöst wurde (Dimmock and Bell,1970; Langford et al.,1971; Dowsett et al.,1978). Während der unterschiedlichsten Stadien der Gravidität erhielten die Muttertiere konsequente Impfungen mit einer rinderbluthaltigen antiprotozoären Vakzine (Dimmock,1973). Diese Mütter produzierten auf Empfang der immunogenen Blutgruppen-Antigene isohämolisierende Alloantikörper unbekannter Subklasse, die gegen mehrere Erythrozytenantigene des Bullen und des Kalbes gerichtet waren (Dowsett et al.,1978). Im Serum, sowie im Kolostrum der Kühe wurden verhältnismäßig hohe Titer von Antikörpern gegen Erythrozytenantigene mit durchschnittlichen Werten von 1/32 und 1/128 gemessen, die mit der Akkumulation der anfallenden Antikörper infolge der konsekutiven Impfungen erklärt wurden. Der indirekte Coombs-Test fiel ebenfalls sowohl für die serologischen, als auch für die kolostralen Antikörper positiv aus (Langford et al.,1971).

Ähnlich wie bei der BNP konnten also Alloantikörperreaktionen im Serum und im Kolostrum nachgewiesen werden. Allerdings traten bei der BNP schon die ersten Krankheitsfälle bei Kälbern auf, deren Mütter lediglich einmalig mit Pregsure BVD geimpft wurden (Friedrich et al.,2009). Langford et al. (1971) nahmen dagegen an, dass die konsekutiven Impfungen der Kühe (bis zu sechs Mal innerhalb einer Laktation) gegen Babesiose die Inzidenz der Isoimmunisierung der Kälber zusätzlich potenzierten. Der antiprotozoäre Totimpfstoff enthielt damals erythrozytenhaltiges Rinderblut und wurde zudem aus der Milz von immunisierten Kälbern gewonnen (Callow and Mellors,1966). Der BNP transferierende BVD-Impfstoff wurde in der bovinen Nierenzelllinie MDBK (Mabin-Darby bovine kidney cells) in Kombination mit fetalem Kälberserum hergestellt (Howard et al.,1994). In beiden Fällen, sowohl bei der Babesiose-Impfung als auch bei der Pregsure BVD-Impfung, kam es also bei einigen Kühen auf Empfang der immunogenen Antigene zu einer erhöhten Produktion von alloreaktiven Antikörpern, die gegen die Antigene des Kalbes gerichtet waren, wenn das Kälb Träger der Zielantigene war. Welche IgG-Subklasse für die Entstehung der isoimmunhämolytischen Anämie verantwortlich war, blieb damals aber ungeklärt.

In Pregsure BVD ist u.a. inaktiviertes, zytopathogenes BVD Virus Typ1 enthalten (Sjolander et al.,1997). Die Untersuchung eines anderen (namentlich nicht

erwähnten) inaktivierten BVDV-Impfstoffes, der sowohl Virus Typ1 als auch Typ2 enthielt, zeigte eine erhöhte humorale wie auch zellvermittelte Immunreaktion, bei der vor allem eine IFN-gamma (Th1-Antwort) induzierte IgG2-Synthese mit neutralisierenden Eigenschaften gegen das BVD-Virus erzielt wurde (Platt et al.,2008). Bei einer natürlichen Infektion mit BVDV bildet das Rind aber neben den IgG2-Antikörpern auch IgG1-Antikörper zum Schutz gegen die Erkrankung (Howard,1990). Demzufolge benötigt das Rind beide IgG-Isotypen für eine optimale Immunreaktion gegen das BVDV. Pregsure BVD enthält zudem noch Quil A, ein Adjuvans, das immun-stimulierende Komplexe (ISCOMS) zur Potenzierung von Immunreaktionen formt (Sjolander et al.,1997). Quil A generiert im Immunsystem der geimpften Kuh sowohl Th1- als auch Th2-abhängige Immunreaktionen mit der Produktion von IgG2- und IgG1-Antikörpern (Sjolander et al.,1997). Daher potenzieren Adjuvantien hauptsächlich die Immunantworten und werden zum Erlangen gewünschter immunologischer Funktionen eingesetzt (Sjolander et al.,1997). Studien zur Prüfung der Wirksamkeit von Pregsure BVD wiesen im Jahre 2004 nach, dass die Tiere bereits nach der Grundimmunisierung hohe serum-neutralisierende Antikörpertiter (jedoch ohne Bestimmung der IgG-Isotypen) gegen alle getesteten europäischen BVDV-Typ-1 oder -Typ-2-Stämme entwickelten (Raue et al.; Salt et al.,2004). Anhand dieser breiten Kreuzneutralisationsaktivität gegen verschiedene BVD-Virusisolate wurde Pregsure BVD für den Einsatz in Europa als besonders geeignet befunden (Salt et al.,2004). Die Ergebnisse vorliegender Arbeit weisen darauf hin, dass einige Pregsure BVD-geimpfte Kühe Immunreaktion generieren, die in einigen Fällen in einer erhöhten Synthese von alloreaktiven IgG1-Antikörpern mit unerwünschten Nebenwirkungen resultierte. Diese Nebeneffekte könnten neben dem Adjuvans zudem noch mit pathogenen Eigenschaften des Virusantigens einerseits und der genetischen Variabilität der geimpften Kühe und deren Nachwuchs andererseits abhängen.

Eine quantitative und qualitative Bestimmung der IgG-Isotypen infolge der Pregsure BVD-Impfung, insbesondere bei den BNP-Überträgerkühen, könnte weitere Erkenntnisse zum Verständnis der Vakzine und ihrem Potenzial, diverse Immunantworten zu induzieren, erbringen.

Die Impfung mit Pregsure BVD generiert darüber hinaus nicht nur bei Rindern, sondern auch bei Meerschweinchen eine erhöhte Synthese alloreaktiver Antikörper

(Bastian et al., 2011), während andere BVD-Impfstoffe keine Produktion alloreaktiver Antikörper induzierten. Zudem wurde gezeigt, dass jene serologischen Alloantikörper an bovine Leukozyten und MDBK-Zellen binden (Bastian et al., 2011; Deutschens et al., 2011). Im Hinblick auf die hochgradige Thrombozytopenie von BNP-Kälbern (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009) spielen neben den Leukozyten also vor allem auch die Thrombozyten eine zentrale Rolle in der Entstehung der Erkrankung. Bisher standen jedoch weder die Thrombozyten noch die Leukozytensubpopulationen im Vordergrund vorangegangener Studien.

Um folglich nähere Informationen über jene Zielzellen zu erhalten, wurden die einzelnen Zellsubpopulationen mittels immunzytologischer Doppelfärbungen unter Einsatz von Thrombozyten- und Leukozyten-spezifischen CD-Markern bestimmt. In diesem Versuch war das Kolostrum direkt mit FITC gekoppelt, wodurch der Einsatz des sekundären anti-bovinen Ig-Antikörpers und somit dessen B-Zellreaktionen, die sonst nicht von den eigentlich gesuchten Alloantikörperreaktionen zu unterscheiden waren, entfielen. Mit diesem Ansatz konnten wir klar zeigen, dass 75% der CD21⁺ B-Zellen (Abb. 4.11A, rot) von BNP-IgG1-Antikörpern gebunden wurden (gelb). Die Zugabe von BNP-Kolostrum zeigte schließlich auch, dass ca. 80% der zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten (Abb. 4.11B) von IgG1-Antikörpern gebunden wurden, während die CD4⁺ T-Helferzellen interessanterweise nur sehr vereinzelt doppelt positive Bindungen aufwiesen (Abb. 4.11C). Die Zellen der lymphoiden Reihe, vor allem die CD4⁺ T-Lymphozyten, scheinen somit nicht die primären Zielzellen der pathogenen IgG1-Alloantikörper zu sein.

Des Weiteren ergaben sich intensive alloreaktive IgG1-Antikörperbindungen an 100% der Thrombozyten (CD41/61⁺), Granulozyten (CD172a⁺) und Monozyten (CD14⁺) (Abb. 4.12A, 4.12B, 4.12C), womit das Zielantigen folglich auf allen Zellen der myeloiden Reihe und Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und einigen wenigen CD4⁺ T-Zellen exprimiert zu sein scheint. Die myeloiden Zellen bilden also die bevorzugten Zielzellen für die IgG1-Alloantikörper und nach wie vor unabhängig von Rasse, Geschlecht und Alter der jeweiligen Blutspender. Diese Ergebnisse stimmen zudem mit den Blutbefunden der an BNP erkrankten Kälber, die massive Thrombozytopenien und Leukozytopenien mit hochgradiger Neutropenie aufwiesen, deutlich überein (Friedrich et al., 2009; Pardon et al., 2009).

Der Einsatz von Techniken der Immunzytologie mittels Mikroskopie stellt nach wie vor eine geeignete Methodik in der Veterinär- und Humanmedizin dar, um klinisch-pathologische Zusammenhänge bei Autoimmunerkrankungen zu beurteilen (Eberhardt et al.,2011; Skoog and Tani,2011). Es können sowohl intrazelluläre als auch an der Zelloberfläche gebundene Proteine mit dieser Methodik erfasst werden (Bennett et al.,2009). Zudem lässt sich anhand dieser Technik der Prozentsatz der Zellen ermitteln, die ein bestimmtes Antigen tragen, für das der Antikörper spezifisch ist (Skoog and Tani,2011).

Mit Hilfe dieser Methodik konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal neben der Identifikation der Zielzellen auch intensive Zellmembran- sowie Zytoplasma-assoziierte Alloantikörperreaktionen bei allen Zellen der myeloiden Reihe (Abb. 4.12Ad, 4.12Bd, 4.12Cd) und Subpopulationen der B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen, weniger auf denen der CD4⁺ T-Zellen (Abb. 4.11Ad, Abb. 4.11Bd, Abb. 4.11Cd) erfasst werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die Leukozytenpopulationen als auch die Thrombozyten entweder ein oder mehrere Alloantigene exprimieren, die auf der Membran und auch im Zytoplasma der entsprechenden Zielzellen lokalisiert sein müssen. Zur näheren Identifikation der Zielantigenstrukturen bedarf es jedoch weitere Untersuchungen. Mit Hilfe unserer Ergebnisse konnten schon erste Erkenntnisse zur Aufklärung des Zielantigens gewonnen werden. Eine geeignete Methodik zur Analyse der IgG1-Antikörpergebundenen Proteine stellt auch die Massenspektrometrie dar und wird, so ist zu hoffen, in weiterführenden Untersuchungen die Identität des Alloantigens liefern.

Andere Untersucher zeigten mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS =fluorescence activated cell sorting), dass auch die Seren von BNP-Überträgerkühen Alloantikörper enthielten, die an Kälberleukozyten gebunden haben (Pardon et al.,2009; Bridger et al.,2011). Die Untersuchungen ergaben jedoch einerseits signifikant mehr IgG-Alloantikörperbindungen (aus BNP- und Kontrollseren) auf allen Leukozytenpopulationen als in unserer Studie (Pardon et al.,2010) und andererseits mehr Bindungen auf den Lymphozyten und Monozyten, weniger aber auf den Granulozyten (Bridger et al.,2011). Diese Variationen der Alloantikörper gebundenen Leukozytenpopulationen könnten aus der angewendeten Technik resultieren. In beiden Studien wurden die Zielzellen nicht mittels zellspezifischen CD-Markern charakterisiert, sondern lediglich nach Vorwärts-Seitwärtsstreuung des Lasers als

Lymphozyten und Granulozyten identifiziert (Pardon et al., 2009; Bridger et al., 2011). Mit Hilfe der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität („*mean fluorescence intensity*“, MFI), dem Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel (Janossy, 2004), wurden dann die Antikörper gebundenen Zellen bestimmt. Zur Markierung der Antikörper gebunden Leukozyten wurden zwar ähnlich wie in unseren Experimenten anti-bovine IgG-Antikörper aus dem Kaninchen (Pardon et al., 2009) oder Schaf (Bridger et al., 2011) verwendet, jedoch in deutlich höherer Konzentration (1:200) und ohne einen Vergleich mit Isotypkontrollen herzustellen (Pardon et al., 2009; Bridger et al., 2011). Des Weiteren wurden im Gegensatz zu unseren Untersuchungen die PBL-Präparate mittels Ammoniumchlorid-Lyse hergestellt (Bridger et al., 2011; Pardon et al., 2009), wobei in der Regel ein nicht definierter Anteil der Granulozyten verloren geht (Janossy, 2004) und die Interpretation jener Daten demzufolge deutlich erschwert wird. Außerdem wurden die Blutzellen nicht permeabilisiert (Pardon et al., 2009; Bridger et al., 2011), weshalb nur zellmembranständige und keine intrazellulären Antikörperbindungen erfasst werden konnten.

Die Durchflusszytometrie hat hier also nur den Vorteil, in kürzester Zeit eine große Zellpopulation zu erfassen. Dagegen bringt diese Methode den Nachteil mit sich, keine exakten Informationen über die phänotypischen Bindungsmuster der Alloantikörper an den jeweiligen Zielzellen zu liefern. Aus diesem Grunde war in vorliegender Arbeit die Immunzytochemie Methode der Wahl. Wie unsere Daten klar zeigen, sind es vor allem die Zellen der myeloiden Reihe und Subpopulationen der lymphoiden Zelllinie, die das gesuchte Zielantigen exprimieren. Im nächsten Schritt wäre es durchaus interessant, das Knochenmark und dessen Vorläuferzellen, vor allem die der myeloiden Zellreihe, auf positive IgG1-Antikörperreaktionen zu testen. Die Charakterisierung des Zielantigens im Knochenmark könnte auch einen wichtigen Beitrag zur Kenntnis der Pathogenese der BNP liefern.

Von zwei Arbeitsgruppen wurde kürzlich MHC-Klasse I als Zielantigen der BNP publiziert, nachdem in Seren von Pregsure BVD-geimpften Überträgerkühen dessen Alloreaktivität auf bovinen Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und MDBK-Zellen mit unterschiedlicher Intensität detektiert wurde (Deutskens et al., 2011; Foucras et al., 2011). Verglichen mit unseren Daten wiesen zwar auch hier alle Granulozyten alloreaktive Antikörperbindungen auf, jedoch mit nur sehr geringer Intensität (Foucras

et al., 2011). Darüber hinaus waren wie in unserer Studie auch weniger Lymphozyten Alloantikörperpositiv (Deutskens et al.,2011; Foucras et al.,2011). Interessanterweise exprimieren aber alle Lymphozytenpopulationen das MHC-I-Antigen (Greene et al.,2011), was wiederum gegen die Hypothese der Beteiligung des MHC-I-Alloantigens als Zielantigen spricht. Auch auf den bovinen Thrombozyten wurden alloreaktive anti-MHC-I-Antikörperbindungen erfasst (Foucras et al.,2011). Eine bildgegebene Darstellung erfolgte allerdings nicht. Da das MHC-I-Antigen von allen nukleushaltigen Zellen im Organismus exprimiert wird (Agrawal and Kishore,2000), erscheint die Beteiligung an der Expression des MHC-I-Alloantigens von Thrombozyten auch eher unwahrscheinlich. Jedenfalls existiert anders als beim Menschen (Kao,1987) keine Literatur über die Expression boviner Leukozytenantigene der Klasse 1 (BoLa-I) auf der Oberflächenmembran von Thrombozyten.

Hingegen bestätigen die alloreaktiven BNP-Antikörperbindungen auf den MDBK-Zellen (Deutskens et al.,2011; Foucras et al.,2011) den Zusammenhang des Impfstoffes mit der Krankheitsentstehung. Ob das MHC-I-Antigen hierbei das primäre Zielantigen darstellt, erscheint dennoch fraglich. Das Adjuvans Quil A ist dafür bekannt, das Virusantigen in die Zelle zu transportieren und dem MHC Klasse I zu präsentieren (Sjolander et al.,1997). Allerdings konnte diese Reaktion nicht für einen inaktivierten BVDV-Impfstoff, der beide Virustypen enthielt, nachgewiesen werden (Platt et al.,2008). Unsere Daten sprechen ohnehin gegen MHC-I als Zielantigen, weil im Gegensatz zu den myeloiden Zellen weitaus weniger Zellen der lymphoiden Linie Alloreaktivitäten aufwiesen, obwohl alle Lymphozyten gleichermaßen das MHC-I-Antigen exprimieren (Greene et al.,2011).

Trotzdem wird die Entstehung von BNP mit der möglichen Alloreaktivität des MHC-I-Antigens und der Pathogenese der FAIT beim Menschen in Verbindung gebracht (Foucras et al.,2011). In den letzten Jahrzehnten wurde die Alloreaktivität der humanen MHC-I-Antikörper, die in vereinzelten Fällen mit FAIT detektiert wurden, kontrovers diskutiert (Chow et al.,1992; Taaning,2000; Grainger et al.,2002). Ein Fallbericht über FAIT ergab eine erhöhte HLA-Inkompatibilität, die auf die Anwesenheit von anti-HLA-A24-Antikörpern im Serum der Mutter wie auch des Neugeborenen zurückzuführen war (Starcevic et al.,2010). Antikörper gegen das Thrombozyten-spezifische HPA-3a-Alloantigen, die normalerweise schwerwiegende FAIT induzieren (Bakchoul et al.,2011), konnten dabei nicht gemessen werden

(Starcevic et al.,2010). Allerdings kommt es sehr selten vor, dass sich maternale anti-HLA-I-Antikörper pathogen auf die fetalen Thrombozyten auswirken (Taaning,2000). Außerdem zeigten nähere Untersuchungen eine Korrelation zwischen hohen Titern von ausschließlich anti-HPA-3a-Alloantikörpern und starken Symptomen der FAIT Patienten (Mawas et al.,1997; Killie et al.,2008), während Starcevic et al. (2010) die Anwesenheit von HLA-A24-Antikörpern lediglich in einem nahezu gesunden Neugeborenen mit asymptomatischer FAIT gemessen haben.

Ähnliche pathophysiologische Zusammenhänge, die gegen eine pathogenetische Beteiligung von anti-MHC-I-Alloantikörpern an der Induktion von BNP sprechen, werden auch in der transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI, Transfusion related acute lung injury) beobachtet (Reil et al.,2008). TRALI entwickelt sich ebenfalls aufgrund einer Inkompatibilität der Leukozytenantigene zwischen Blutspender und –empfänger. Nach etwa sechs Stunden der Bluttransfusion kommt es zu schwerwiegenden Symptomen wie Hypoxie und Lungenödem (Shaz et al.,2011). Bei TRALI wird die Anwesenheit von Antikörpern gegen verschiedene Alloantigene, besonders gegen die von HLA-I und 2 sowie HNA-3a, kontrovers diskutiert. Verglichen zu den HLA-I-Alloantikörpern, wird den Antikörpern gegen das HNA-3a-Alloantigen weitaus größere klinische und pathologische Relevanz zugesprochen (Reil et al.,2008; Greinacher et al.,2010; Reil et al.,2011). Alloreaktive Antikörper gegen das humane MHC-I-Antigen werden nämlich in fast allen Blutspendern gemessen, aber die Mehrheit der an TRALI erkrankten Patienten weisen letztendlich erhöhte Titer an anti HNA-3a-Alloantikörpern in Kombination mit HLA-I-Alloantikörpern auf (Reil et al.,2008; Greinacher et al.,2010; Reil et al.,2011). Über Jahrzehnte hinweg wurde also das MHC-I-Alloantigen für die Entstehung von TRALI verantwortlich gemacht; dabei überlagerten die natürlich vorkommenden alloreaktiven anti-MHC-I-Antikörper die tatsächlichen Alloantikörperbindungen jener pathogen wirkender HNA-3a-Alloantikörper (Greinacher et al.,2010; Reil et al.,2011). Nicht zwingend muss also eine Alloreaktivität mit der tatsächlichen Entstehung einer Alloimmunerkrankung assoziiert sein. Ähnliche Fälle kann man bei natürlich vorkommenden Autoantikörpern beobachten, die an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz beteiligt sind (Cojocaru et al.,2009; Ehrenstein and Notley,2010). Die natürlichen Autoantikörper sind mit circa 20% der im Blut zirkulierenden Immunglobuline vertreten (Ochsenbein and Zinkernagel,2000; Cojocaru et al.,2009). Es wurden also folglich Hinweise gefunden, dass HLA-Klasse-1-Alloantikörper,

verglichen zu denen gegen HNA-3a-Antigene, nur schwache bis keine pathogene Wirkung in Bezug auf die Entstehung von TRALI ausüben (Reil et al.,2008).

Demzufolge könnten die bovinen anti-MHC-I-Alloantikörper also auch nicht automatisch für BNP verantwortlich sein, oder aber sie sind in Kombination mit anderen noch unbekannten Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern an der Krankheitsentstehung beteiligt. Eine Blockierung der bovinen MHC-I-Expression mittels siRNA (Deuse et al.,2011) sollte weiteren Aufschluss über die Identifizierung des BNP-spezifischen Antigens erbringen (Foucras et al.,2011). Die Blockierung der MHC-I-Expression von murinen und humanen embryonischen Stammzellen dauert in der Regel bis zu einer Woche an (Deuse et al.,2011), während für das Rind noch keine Daten diesbezüglich existieren. Durch das Ausschalten der MHC-I-Expression könnte man jedenfalls feststellen, welche weiteren Reaktivitäten gegen die Zielzellen noch feststellbar sind, wenn die MHC-I- Expression verschwindet. Der Nachweis einer Reduktion der anti-MHC-I-Alloreaktivität der BNP-Seren konnte zwar nachgewiesen werden (Foucras et al.,2011), ist aber ohne einen Vergleich mit Kontroll-Seren vor und nach dem Ausschalten der MHC-I-Expression nur wenig aussagekräftig. Demnach wirft die Suche nach dem Zielantigen weiterhin noch viele Fragen auf.

Um die BNP-Pathogenese abschließend zu klären, sollten die Postulate von Witebsky erfüllt werden, nach denen ein Krankheitsgeschehen als Autoimmunkrankheit (hier entsprechend Alloimmunkrankheit) definiert wird, wenn folgende Punkte erfüllt werden (Rose and Bona,1993): nachdem jene verantwortlichen Alloantikörper und die damit einhergehenden Immunreaktionen nachgewiesen wurden, ist das nächste Ziel die Identifikation des Alloantigens. Die BNP-Pathogenese ist nur dann abschließend geklärt, wenn die Induktion eines reproduzierbaren analogen Krankheitsgeschehens wie bei einem Kalb mit Hilfe eines Tiermodells gelingt.

Zusammenfassend wurden erstmalig in dieser Studie die immunphänotypischen Eigenschaften der BNP transferierenden Alloantikörper im Kolostrum bestimmt. Die Antikörper, die eine pathogene Alloreaktivität gegen bovine Blutzellen aufweisen, gehören der IgG1-Subklasse an. Bislang wurden für Rinder keine isotypspezifischen Alloimmunerkrankungen dieser Art beschrieben. Epidemiologische Forschungen deuteten auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Entstehung der

alloimmunem BNP und der Impfung der Überträgerkühe mit einem inaktivierten BVDV-Impfstoff hin. Dieser Impfstoff verfügt über eine breite Kreuzneutralisationsaktivität gegen verschiedene BVD-Virusisolate, bei der, ausgehend von den Wirksamkeitsprüfungen verschiedener inaktivierter BVD-Vakzinen, gleichermaßen neutralisierende IgG1- und IgG2-Antikörper gebildet werden, ähnlich wie bei einer natürlichen Infektion mit BVDV. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass infolge der Pregnure BVD-Impfung bestimmte Kühe aber eine Th2-abhängige Alloimmunreaktion generieren, woraufhin eine erhöhte Produktion pathogen wirkender IgG1-Alloantikörper induziert wird. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Zielantigens in dieser Studie ergaben, dass das Expressionsmuster des Zielantigens unabhängig von Alter, Rasse und Geschlecht stabil ist. Das Zielantigen ist auf Zellen der myeloiden Reihe und nur auf Subpopulationen der lymphoiden Zellreihe durchgehend exprimiert. Die Zellmembran- sowie Zytoplasma-assoziierten IgG1-Antikörperpositiven Signale liefern zudem weitere wertvolle Informationen zur Identifikation des für BNP verantwortlichen Zielantigens. Eine Beteiligung verschiedener Zielantigene an der Entstehung von BNP kann dabei nicht ausgeschlossen werden und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Zum abschließenden Beweis der BNP-Pathogenese sollte ein monospezifischer Antikörper in Kälbern die Krankheitssymptome auslösen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die bovine neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine neu auftretende Krankheit bei neugeborenen Kälbern und zeichnet sich durch ihre erhöhte Anfälligkeit zur Blutungsneigung, Thrombozytopenie und Leukozytopenie und einer schwerwiegenden Knochenmarksschädigung aus. BNP kann über die Aufnahme von Kolostrum transferiert werden, woraufhin ein Zusammenhang der Entstehung mit maternalen Alloantikörpern bewiesen wurde. Kürzlich wurde in Seren von BNP-Überträgerkühen die Anwesenheit und Bindung von Alloantikörpern an Leukozyten gesunder Kälber nachgewiesen. Obwohl das Kolostrum eine primäre Rolle bei der Entstehung von BNP spielt, existierten bislang keine Untersuchungen auf immunologischer Basis.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die immunphänotypische Charakterisierung der BNP transferierenden Alloantikörper im Kolostrum, um einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Pathomechanismen zu leisten. Mittels immunzytologischer Färbungen wurde die isotypspezifische Antikörperklasse von BNP-Überträgerkolostren mit Hinblick auf die Bindungsmuster an peripheren Blutleukozyten sowie Thrombozyten identifiziert. Die exakte Phänotypisierung der Zielzellen, Thrombozyten erstmalig eingeschlossen, ergab intensive BNP- Alloantikörperbindungen ausschließlich der Immunglobulinklasse IgG1. Unsere Daten deuten demnach klar auf eine IgG1-vermittelte Alloimmunerkrankung hin, wie sie bei Rindern so noch nie beobachtet wurde.

Die Entstehung von BNP wird mit der Impfung der Überträgerkühe mit einem inaktivierten Impfstoff (Pregsure BVD) in Verbindung gebracht. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass infolge der Pregsure BVD-Impfung bestimmte Kühe eine Th2-abhängige Alloimmunreaktion generierten, woraufhin eine erhöhte Produktion pathogen wirkender IgG1-Alloantikörper induziert wurde. Dabei dürften die Verwendung der bovinen MDBK-Zellen und die Verunreinigung des Impfstoffes mit Zellbestandteilen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von BNP transferierenden Alloantikörpern spielen.

Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Zielantigens in dieser Studie ergaben, dass das Expressionsmuster des Zielantigens unabhängig von Alter, Rasse und Geschlecht stabil ist. Das Zielantigen ist auf Zellen der myeloiden Reihe durchgehend exprimiert und nur auf Subpopulationen der lymphoiden Zellreihe, am

geringsten auf CD4 positiven T-Zellen. Die Zellmembran- sowie Zytoplasma-assoziierten IgG1-Antikörperpositiven Signale liefern zudem weitere wertvolle Informationen zur Charakterisierung des für BNP verantwortlichen Zielantigens. Zur abschließenden Klärung der BNP-Pathogenese sollte nach der Identifikation des pathogenetisch relevanten Zielantigens ein monospezifischer Antikörper in Kälbern die Krankheitssymptome auslösen.

7 SUMMARY

Bovine neonatal pancytopenia (BNP) is a new emerging calf disease, mainly characterized by multiple haemorrhages, thrombocytopenia and leukocytopenia as a result of bone marrow depletion. BNP can be induced in healthy calves through application of colostrum from BNP donors, proofing that BNP is mediated by maternal alloantibodies. Furthermore it has recently been shown that alloantibodies to bovine blood cells were present in sera of BNP dams.

Since immunological characteristics of respective pathogenic alloantibodies were not determined in BNP colostrum so far, we were interested in characterization of the immunoglobulin subclass perpetuating BNP pathogenesis. By performing immunocytological stainings we closely characterized BNP inducing antibodies regarding immunoglobulin subclass and binding specificities to peripheral blood derived leukocytes and platelets. By exact phenotyping the targeted blood cell subsets, including platelets for the first time, we demonstrated that BNP alloantibodies are exclusively of IgG1 subclass. Our findings point to a pathogenic IgG subclass reactivity that has not been reported for cattle so far.

BNP occurrence is associated with vaccination of BNP donors with a certain inactivated BVD vaccine (Pregsure BVD). In our study we found that some Pregsure BVD vaccinated dams may stimulate Th2 cells leading to enhanced IgG1 alloantibody production but with undesirable side effects. The use of bovine MDBK-cells as well as the contamination of the vaccine with cell components may play a pivotal role in formation of BNP transferring alloantibodies.

Further experiments on identifying the target antigen revealed that the alloantigen has a stable expression pattern irrespective of different bovine breeds and cellular maturity of all specimen tested. The target antigen is expressed on all myeloid cells and less on subsets of lymphoid cell lineage, especially CD4⁺ T cells. Membrane and cytoplasm linked signals further aid significant information on identifying target antigen.

But the identity of the pathogenesis inducing alloantibody has yet to be determined by transfer of candidate specific antibody, which should also result in BNP.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Agrawal, S., Kishore, M.C., 2000. MHC class I gene expression and regulation. *J Hematother Stem Cell Res* 9, 795-812.

Ahmed, E.B., Daniels, M., Alegre, M.L., Chong, A.S., 2011. Bacterial infections, alloimmunity, and transplantation tolerance. *Transplant Rev (Orlando)* 25, 27-35.

Arakelov, A., Lakkis, F.G., 2000. The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection. *Semin Nephrol* 20, 95-102.

Arulkanthan, A., Brown, W.C., McGuire, T.C., Knowles, D.P., 1999. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 67, 3481-3487.

Bach, J.F., 2005. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 25 Suppl, 74-80.

Bakchoul, T., Kubiak, S., Krautwurst, A., Roderfeld, M., Siebert, H.C., Bein, G., Sachs, U.J., Santoso, S., 2011. Low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 51, 2455-2461.

Balch, A., Mackin, A., 2007. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compend Contin Educ Vet* 29, 217-225.

Ballingall, K.T., Nath, M., Holliman, A., Laming, E., Steele, P., Willoughby, K., 2011. Lack of evidence for an association between MHC diversity and the development of bovine neonatal pancytopenia in Holstein dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 128-132.

Bastian, M., Holsteg, M., Hanke-Robinson, H., Duchow, K., Cussler, K., 2011. Bovine Neonatal Pancytopenia: Is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine* 29 (32), 5267-5275.

- Bell, C.R., Scott, P.R., Sargison, N.D., Wilson, D.J., Morrison, L., Howie, F., Willoughby, K., Penny, C.D., 2010. Idiopathic bovine neonatal pancytopenia in a Scottish beef herd. *Vet Rec* 167, 938-940.
- Bennett, B.T., Bewersdorf, J., Knight, K.L., 2009. Immunofluorescence imaging of DNA damage response proteins: optimizing protocols for super-resolution microscopy. *Methods* 48, 63-71.
- Berghaus, L.J., Corbeil, L.B., Berghaus, R.D., Kalina, W.V., Kimball, R.A., Gershwin, L.J., 2006. Effects of dual vaccination for bovine respiratory syncytial virus and *Haemophilus somnus* on immune responses. *Vaccine* 24, 6018-6027.
- Besser, T.E., Gay, C.C., 1985. Septicemic colibacillosis and failure of passive transfer of colostral immunoglobulin in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1, 445-459.
- Besser, T.E., Gay, C.C., 1994. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10, 107-117.
- Bluestone, J.A., Abbas, A.K., 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3, 253-257.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., 2001. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J* 79, 832-839.
- Bottomly, K., 1988. A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes. *Immunol Today* 9, 268-274.
- Boyle, A.G., Magdesian, K.G., Ruby, R.E., 2005. Neonatal isoerythrolysis in horse foals and a mule foal: 18 cases (1988-2003). *J Am Vet Med Assoc* 227, 1276-1283.
- Bridger, P.S., Bauerfeind, R., Wenzel, L., Bauer, N., Menge, C., Thiel, H.J., Reinacher, M., Doll, K., 2011. Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 1-10.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Palmer, G.H., Chantler, S.E., Estes, D.M., 1999. Bovine CD4(+) T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of

Babesia bigemina stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. Infect Immun 67, 155-164.

Brush, P.J., Anderson, P.H., Gunning, R.F., 1987. Identification of factor XI deficiency in Holstein-Friesian cattle in Britain. Vet Rec 121, 14-17.

Buechner-Maxwell, V., Scott, M.A., Godber, L., Kristensen, A., 1997. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in a quarter horse foal. J Vet Intern Med 11, 304-308.

Bush, L.J., Staley, T.E., 1980. Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. J Dairy Sci 63, 672-680.

Butler, J.E., 1973. Synthesis and Distribution of Immunoglobulins. J. Am.Vet. Med.Assoc. 163, 795-798.

Butler, J.E., 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. Vet Immunol Immunopathol 4, 43-152.

Butler, J.E., 1998. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. Rev Sci Tech 17, 43-70.

Butler, J.E., Brown, W.R., 1994. The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine. Vet Immunol Immunopathol 43, 5-12.

Callow, L.L., Mellors, L.T., 1966. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. Aust Vet J 42, 464-465.

Chan, O., Shlomchik, M.J., 1998. A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. J Immunol 160, 51-59.

Chan, O.T., Madaio, M.P., Shlomchik, M.J., 1999. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. Immunol Rev 169, 107-121.

Chattha, K.S., Firth, M.A., Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2009. Age related variation in expression of CD21 and CD32 on bovine lymphocytes: a cross-sectional study. Vet Immunol Immunopathol 130, 70-78.

- Chattha, K.S., Firth, M.A., Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2010. Variation in expression of membrane IgM, CD21 (CR2) and CD32 (FcγRIIB) on bovine lymphocytes with age: a longitudinal study. *Dev Comp Immunol* 34, 510-517.
- Chow, M.P., Sun, K.J., Yung, C.H., Hu, H.Y., Tzeng, J.L., Lee, T.D., 1992. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to HLA-A2 antibody. *Acta Haematol* 87, 153-155.
- Christen, U., von Herrath, M.G., 2004. Initiation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 16, 759-767.
- Coffman, R.L., Lebman, D.A., Rothman, P., 1993. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* 54, 229-270.
- Cohen, I.R., 2000. Discrimination and dialogue in the immune system. *Semin Immunol* 12, 215-219; discussion 257-344.
- Cojocaru, M., Cojocaru, I.M., Silosi, I., 2009. The significance of natural autoantibodies. *Maedica. Journal of Clinical Medicine* 4, 22-25.
- Corbeil, L.B., 2002. Antibodies as effectors. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 169-175.
- Corbeil, L.B., Gogolewski, R.P., Kacs Kovics, I., Nielsen, K.H., Corbeil, R.R., Morrill, J.L., Greenwood, R., Butler, J.E., 1997. Bovine IgG2a antibodies to *Haemophilus somnus* and allotype expression. *Can J Vet Res* 61, 207-213.
- Corbière, F., Foucras, G., Lacroux, C., Meyer, G., Schelcher, F., 2009. Haemorrhagic diathesis syndrome: clinical and epidemiological findings of 48 suspected cases in France, 2007-2009. In: *Proc. Satellite Symp. "Haemorrhagic Diathesis in Calves"*. In: *Europ. Buiatrics Forum*, pp. 3-11.
- Cusick, M.F., Libbey, J.E., Fujinami, R.S., 2011. Molecular Mimicry as a Mechanism of Autoimmune Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*.
- Deuse, T., Seifert, M., Phillips, N., Fire, A., Tyan, D., Kay, M., Tsao, P.S., Hua, X., Velden, J., Eiermann, T., Volk, H.D., Reichenspurner, H., Robbins, R.C., Schrepfer, S., 2011. Human leukocyte antigen I knockdown human embryonic stem cells induce host ignorance and achieve prolonged xenogeneic survival. *Circulation* 124, S3-9.

Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C.M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H.J., Rumenapf, T., 2011. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet Res* 42, 97.

Dimmock, C.K., 1973. Blood group antibody production in cattle by a vaccine against *Babesia argentina*. *Res Vet Sci* 15, 305-309.

Dimmock, C.K., Bell, K., 1970. Haemolytic disease of the newborn in calves. *Aust Vet J* 46, 44-47.

Doll, K., Moenning, V., 2002. Bovine Virusdiarrhoe/ Mucosal- Disease-Komplex. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Parey, Berlin.

Dowsett, K.F., Dimmock, C.K., Hill, M.W., 1978. Haemolytic disease in new born calves. *Aust Vet J* 54, 65-67.

Eberhardt, C., Amann, B., Stangassinger, M., Hauck, S.M., Deeg, C.A., 2011. Isolation, characterization and establishment of an equine retinal glial cell line: a prerequisite to investigate the physiological function of Muller cells in the retina. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*.

Ehrenstein, M.R., Notley, C.A., 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* 10, 778-786.

Elghetany, M.T., 2002. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis* 28, 260-274.

Estes, D.M., Closser, N.M., Allen, G.K., 1994. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. *Cell Immunol* 154, 287-295.

Estes, D.M., Hirano, A., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A., Brown, W.C., 1995. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol* 163, 268-279.

Fellah, J.S., Wiles, M.V., Charlemagne, J., Schwager, J., 1992. Evolution of vertebrate IgM: complete amino acid sequence of the constant region of *Ambystoma mexicanum* mu chain deduced from cDNA sequence. *Eur J Immunol* 22, 2595-2601.

Firth, M.A., Shewen, P.E., Hodgins, D.C., 2005. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Anim Health Res Rev* 6, 143-158.

Foley, J.A., Otterby, D.E., 1978. Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum: A Review. *J. Dairy Sci.* 61, 1033-1066.

Forster, L.M., 2007. Neonatal alloimmune thrombocytopenia, purpura, and anemia in 6 neonatal piglets. *Can Vet J* 48, 855-857.

Foucras, G., Corbiere, F., Tasca, C., Pichereaux, C., Caubet, C., Trumel, C., Lacroux, C., Franchi, C., Burlet-Schiltz, O., Schelcher, F., 2011. Alloantibodies against MHC Class I: A Novel Mechanism of Neonatal Pancytopenia Linked to Vaccination. *J Immunol.*

Franks, D., 1962. Horse blood groups and hemolytic disease of the newborn foal. *Ann N Y Acad Sci* 97, 235-250.

Friedrich, A., Buttner, M., Rademacher, G., Klee, W., Weber, B.K., Muller, M., Carlin, A., Assad, A., Hafner-Marx, A., Sauter-Louis, C.M., 2011. Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Vet Res* 7, 10.

Friedrich, A., Rademacher, G., Weber, B.K., Kappe, E.C., Carlin, A., Assad, A., Sauter- Louis, C., Hafner-Marx, A., Büttner, M., Böttcher, J., Klee , W., 2009. Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarksschädigung bei jungen Kälbern. *Tierärztliche Umschau* 64, 423-431.

Fuentes-Panana, E.M., Bannish, G., Monroe, J.G., 2004. Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. *Immunol Rev* 197, 26-40.

Gajanayake, I., Niessen, S.J., Cherubini, G.B., Diane Shelton, G., 2008. Autoimmune myasthenia gravis and dysautonomia in a dog. *J Small Anim Pract* 49, 593-595.

- Geene, J.J., 1986. Absorption of colostral immunoglobulins. *Tijdschr Diergeneeskd* 111, 576-583.
- Gentry, P.A., Cheryk, L.A., Shanks, R.D., Healey, R., 1997. An inherited platelet function defect in a Simmental crossbred herd. *Can J Vet Res* 61, 128-133.
- Goker, H., Haznedaroglu, I.C., Chao, N.J., 2001. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol* 29, 259-277.
- Goodnow, C.C., 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2264-2271.
- Grainger, J.D., Morrell, G., Yates, J., Deleacy, D., 2002. Neonatal alloimmune thrombocytopenia with significant HLA antibodies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 86, F200-201.
- Gramatges, M.M., Fani, P., Nadeau, K., Pereira, S., Jeng, M.R., 2009. Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. *Pediatr Blood Cancer* 53, 97-99.
- Greene, J.M., Wiseman, R.W., Lank, S.M., Bimber, B.N., Karl, J.A., Burwitz, B.J., Lhost, J.J., Hawkins, O.E., Kunstman, K.J., Broman, K.W., Wolinsky, S.M., Hildebrand, W.H., O'Connor, D.H., 2011. Differential MHC class I expression in distinct leukocyte subsets. *BMC Immunol* 12, 39.
- Greinacher, A., Wesche, J., Hammer, E., Furl, B., Volker, U., Reil, A., Bux, J., 2010. Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat Med* 16, 45-48.
- Hamers, C., Couvreur, B., Dehan, P., Letellier, C., Lewalle, P., Pastoret, P.P., Kerkhofs, P., 2000. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J* 160, 250-258.
- Heriazon, A., Hamilton, K., Huffman, J., Wilkie, B.N., Sears, W., Quinton, M., Mallard, B.A., 2011. Immunoglobulin isotypes of lactating Holstein cows classified as high, average, and low type-1 or -2 immune responders. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Hofmann, W., 1972. [Hemorrhagic diathesis in calves caused by chronic furazolidone poisoning]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 79, 289-292.

- Holloway, N.M., Tyler , J.W., Lakritz , J., Carison, S.L., J., H., 2001. Serum immunoglobulin G concentrations in calves fed fresh an frozen colostrum. J. Am.Vet. Med.Assoc. 219, 357-359.
- Horsch, R.N., 1977. Immunprophylaxe bei Nutztieren. Verlag Fischer, Jena.
- Howard, C.J., 1990. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. Rev Sci Tech 9, 95-103.
- Howard, C.J., Clarke, M.C., Sopp, P., Brownlie, J., 1994. Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. Vet Microbiol 42, 171-179.
- Huizing, K., Roislien, J., Hansen, T., 2008. Intravenous immune globulin reduces the need for exchange transfusions in Rhesus and AB0 incompatibility. Acta Paediatr 97, 1362-1365.
- Ibeagha-Awemu, E.M., Lee, J.W., Ibeagha, A.E., Zhao, X., 2008. Bovine CD14 gene characterization and relationship between polymorphisms and surface expression on monocytes and polymorphonuclear neutrophils. BMC Genet 9, 50.
- Janeway, C.A., Jr., 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol Today 13, 11-16.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Jones, E.W., 1977. Medizinische Mikrobiologie, Vol. 4. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Juel, V.C., Massey, J.M., 2007. Myasthenia gravis. Orphanet J Rare Dis 2, 44.
- Kacskovics, I., 2004. Fc receptors in livestock species. Vet Immunol Immunopathol 102, 351-362.
- Kähn, W., Vaala, W., Palmer, J., 1991. Die neonatale Isoerythrolyse beim neugeborenen Fohlen. Tierärztl. Praxis 19, 521-529.
- Kao, K.J., 1987. Plasma and platelet HLA in normal individuals: quantitation by competitive enzyme-linked immunoassay. Blood 70, 282-286.

Kaplan, C., 2006. Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopaenia. *Orphanet J Rare Dis* 1, 39.

Kappe, E.C., Halami, M.Y., Schade, B., Alex, M., Hoffmann, D., Gangl, A., Meyer, K., Dekant, W., Schwarz, B.A., Johne, R., 2010. Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr.* 123, 31-41.

Khalaj, M., Abbasi, A.R., Shimojo, K., Moritomo, Y., Yoneda, K., Kunieda, T., 2009. A missense mutation (p.Leu2153His) of the factor VIII gene causes cattle haemophilia A. *Anim Genet* 40, 763-765.

Kidd, P., 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8, 223-246.

Killie, M.K., Husebekk, A., Kjeldsen-Kragh, J., Skogen, B., 2008. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica* 93, 870-877.

Kociba, G.J., Ratnoff, O.D., Loeb, W.F., Wall, R.L., Heider, L.E., 1969. Bovine plasma thromboplastin antecedent (Factor XI) deficiency. *J Lab Clin Med* 74, 37-41.

Korhonen, H., Marnila, P., Gill, H.S., 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr* 84 75-80.

Krappmann, K., Weikard, R., Gerst, S., Wolf, C., Kuhn, C., 2011. A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Vet J.*

Kruse, P.E., 1983. The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Ann Rech Vet* 14, 349-353.

Landsteiner, K., 1901. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. In, *Klin. Wochenschrift*, Vol. 14, City, pp. 956-958.

Langford, G., Knott, S.G., Dimmock, C.K., Derrington, P., 1971. Haemolytic disease of newborn calves in a dairy herd in Queensland. *Aust Vet J* 47, 1-4.

Larson, B.L., Heary, H.L., Jr., Devery, J.E., 1980. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci* 63, 665-671.

Lascelles, A.K., 1979. The immune system on the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *J.Dairy Sci.* 62, 154-167.

Levieux, D., Ollier, A., 1999. Bovine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J Dairy Res* 66, 421-430.

Marron, B.M., Robinson, J.L., Gentry, P.A., Beever, J.E., 2004. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. *Anim Genet* 35, 454-456.

Mawas, F., Wiener, E., Williamson, L.M., Rodeck, C.H., 1997. Immunoglobulin G subclasses of anti-human platelet antigen 1a in maternal sera: relation to the severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 59, 287-292.

Mayer, B., Doleschall, M., Bender, B., Bartyik, J., Bosze, Z., Frenyo, L.V., Kacskovics, I., 2005. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *J Dairy Res* 72 Spec No, 107-112.

Mayer, B., Zolnai, A., Frenyo, L.V., Jancsik, V., Szentirmay, Z., Hammarstrom, L., Kacskovics, I., 2002a. Localization of the sheep FcRn in the mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 327-330.

Mayer, B., Zolnai, A., Frenyo, L.V., Jancsik, V., Szentirmay, Z., Hammarstrom, L., Kacskovics, I., 2002b. Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology* 107, 288-296.

McCullough, S., 2003. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 1295-1315.

McGuire, T.C., Musoke, A.J., 1981. Biologic activities of bovine IgG subclasses. *Adv Exp Med Biol* 137, 359-366.

- McGuire, T.C., Musoke, A.J., Kurtti, T., 1979. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 38, 249-256.
- Miller, J., 2004. Self-nonsel self discrimination by T lymphocytes. *C R Biol* 327, 399-408.
- Moingeon, P., Haensler, J., Lindberg, A., 2001. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 19, 4363-4372.
- Morein, B., Blomqvist, G., Hu, K., 2007. Immune responsiveness in the neonatal period. *J Comp Pathol* 137 Suppl 1, S27-31.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Naparstek, Y., Plotz, P.H., 1993. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 11, 79-104.
- Newby, T.J., Bourne, J., 1977. The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. *J Immunol* 118, 461-465.
- Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21, 624-630.
- Oldstone, M.B., 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819-820.
- Olson, J.K., Ercolini, A.M., Miller, S.D., 2005. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 296, 39-53.
- Pardon, B., Steukers, L., Dierick, J., Ducatelle, R., Saey, V., Maes, S., Vercauteren, G., De Clercq, K., Callens, J., De Bleecker, K., Deprez, P., 2009. Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: an emerging syndrome in Europe. *Transbound Emerg Dis* 57, 135-146.

Pardon, B., Stuyven, E., Stuyvaert, S., Hostens, M., Dewulf, J., Goddeeris, B.M., Cox, E., Deprez, P., 2010. Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 293-300.

PEI, Paul-Ehrlich-Institut, 2011. Aktuelle Information zum Impfstoff PregSure BVD In. http://www.pei.de/cln_092/nn_1686480/DE/infos/tieraerzte/pharm-vet/uaw-vet/bnp/110831-bnp-ruecknahme-zulassung.html.

Pfisterer, H., Thierfelder, S., Stich, W., 1968. ABO Rh blood groups and platelet transfusion. *Blut* 17, 1-5.

Pitkanen, J., Peterson, P., 2003. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun* 4, 12-21.

Platt, R., Coutu, C., Meinert, T., Roth, J.A., 2008. Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhea virus vaccine in beef cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 122, 8-15.

Ploegaert, T.C., Tijhaar, E., Lam, T.J., Taverne-Thiele, A., van der Poel, J.J., van Arendonk, J.A., Savelkoul, H.F., Parmentier, H.K., 2011. Natural antibodies in bovine milk and blood plasma: Variability among cows, repeatability within cows, and relation between milk and plasma titers. *Vet Immunol Immunopathol*.

Porter, P., 1973. The functional role of secretory antibody systems in early development of the pig and the calf. *Proc Nutr Soc* 32, 217-222.

Proulx, C., Fillion, M., Goldman, M., Bradley, A., Devine, D., Decary, F., Chartrand, P., 1994. Analysis of immunoglobulin class, IgG subclass and titre of HPA-1a antibodies in alloimmunized mothers giving birth to babies with or without neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 87, 813-817.

Radbruch, A., 2000. Flow cytometry and cell sorting. Springer, Berlin ; New York.

Raue, R., Harmeyer, S.S., Nanjiani, I.A., Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *Vet J* 187, 330-334.

- Reil, A., Keller-Stanislawski, B., Gunay, S., Bux, J., 2008. Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang* 95, 313-317.
- Reil, A., Wesche, J., Greinacher, A., Bux, J., 2011. Geno- and phenotyping and immunogenicity of HNA-3. *Transfusion* 51, 18-24.
- Reth, M., 1992. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97-121.
- Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R., Marsh, S.G., 2010. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res* 38, D863-869.
- Robison, J.D., Stott, G.H., DeNise, S.K., 1988. Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. *J Dairy Sci* 71, 1283-1287.
- Rose, N.R., Bona, C., 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14, 426-430.
- Salt, S., Antonis, A.F.G., Peters, A.R., Brune, A., Jahnecke, S., Traeder, W., Harmeyer, S.S., 2004. PregSure® BVD – eine neue inaktivierte BVD-Vakzine Breite Kreuzneutralisation von europäischen BVDV-Typ-1- und -Typ-2-Stämmen und signifikante Verbesserung der Fertilität nach Testinfektionen. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 4, 191-195.
- Sanchez-Miguel, C., McElroy, M., Walsh, E., 2010. Bovine neonatal pancytopenia in calves in Ireland. *Vet Rec* 166, 664.
- Sasaki, M., Davis, C.L., Larson, B.L., 1976. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *J Dairy Sci* 59, 2046-2055.
- Schnorr, B., Kressin, M., 2001. *Embryologie der Haustiere*, Vol. 4. Auflage. Enke Verlag Stuttgart.
- Schroter, P., Kuiper, H., Holsteg, M., Puff, C., Haas, L., Baumgartner, W., Ganter, M., Distl, O., 2011. [Reproducibility of bovine neonatal pancytopenia (BNP) via the application of colostrum]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124, 390-400.
- Shaz, B.H., Stowell, S.R., Hillyer, C.D., 2011. Transfusion-related acute lung injury: from bedside to bench and back. *Blood* 117, 1463-1471.

Silvestre-Ferreira, A.C., Pastor, J., 2010. Feline neonatal isoerythrolysis and the importance of feline blood types. *Vet Med Int* 2010, 753726.

Sjolander, A., van't Land, B., Lovgren Bengtsson, K., 1997. Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol* 177, 69-76.

Skoog, L., Tani, E., 2011. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology* 22, 215-229.

Skylouriotis, P., Skylouriotis-Lazarou, M., Natter, S., Steiner, R., Spitzauer, S., Kapiotis, S., Valent, P., Hirschl, A.M., Guber, S.E., Laufer, G., Wollenek, G., Wolner, E., Wimmer, M., Valenta, R., 1999. IgG subclass reactivity to human cardiac myosin in cardiomyopathy patients is indicative of a Th1-like autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 115, 236-247.

Smith, K.L., Muir, L.A., Ferguson, L.C., Conrad, H.R., 1971. Selective transport of IgG1 into the mammary gland: role of estrogen and progesterone. *J Dairy Sci* 54, 1886-1894.

Smolenaars A, J., G., Mars M, H., 2009. Epidemiology and diagnostic results of haemorrhagic disease syndrome in The Netherlands. In: *Proc. Satellite Symp. "Haemorrhagic Diathesis in Calves"*. In: *Europ. Buiatrics Forum*, Marseilles.

Snapper, C.M., Paul, W.E., 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944-947.

Starcevic, M., Tomicic, M., Malenica, M., Zah-Matakovic, V., 2010. Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by anti-HLA-A24 alloantibodies. *Acta Paediatr* 99, 630-632.

Stevens, T.L., Bossie, A., Sanders, V.M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R.L., Mosmann, T.R., Vitetta, E.S., 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334, 255-258.

Stöber, M., 2006. Krankheiten des Blutes; Fütterungs-, mangel- oder vergiftungsbedingte Krankheiten des Blutes. In: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Parey, Stuttgart.

Stott, G.H., Marx, D.B., Menefee, B.E., Nightengale, G.T., 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. J Dairy Sci 62, 1632-1638.

Taaning, E., 2000. HLA antibodies and fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: myth or meaningful? Transfus Med Rev 14, 275-280.

Tizard, I.R., 1977. Veterinary Immunology. W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto.

Wang, H., Shlomchik, M.J., 1999. Autoantigen-specific B cell activation in Fas-deficient rheumatoid factor immunoglobulin transgenic mice. J Exp Med 190, 639-649.

Weaver, D.M., Tyler, J.W., VanMetre, D.C., Hostetler, D.E., Barrington, G.M., 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. J Vet Intern Med 14, 569-577.

Weinstein, L., 1982. Irregular antibodies causing hemolytic disease of the newborn: a continuing problem. Clin Obstet Gynecol 25, 321-332.

Welsh, M.D., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunology 114, 101-111.

Willoughby, K., Gilray, J., Maley, M., Dastjerdi, A., Steinbach, F., Banks, M., Scholes, S., Howie, F., Holliman, A., Baird, P., McKillen, J., 2010. Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia. Vet Rec 166, 436-437.

Wujanz, G., 1979. [Results of blood transfusion in anemia of dairy cattle with references to serological tolerance]. Arch Exp Veterinarmed 33, 449-456.

Zelenay, S., Moraes Fontes, M.F., Fesel, C., Demengeot, J., Coutinho, A., 2007. Physiopathology of natural auto-antibodies: the case for regulation. J Autoimmun 29, 229-235.

Zinkernagel, R.M., 1993. Immune protection vs. immunopathology vs. autoimmunity: a question of balance and of knowledge. Brain Pathol 3, 115-121.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klee und Frau PD Dr. Deeg, zum Einen für die Überlassung dieses interessanten und ungewöhnlichen Themas, zum Anderen für die stets freundliche und gute Betreuung während der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit. Vor allem in der experimentellen Phase meiner Dissertation stand mir Frau PD Dr. Deeg jederzeit mit wertvollen Anregungen zur Seite und unterstützte mich stets durch ihre Bereitschaft, Ergebnisse und Hypothesen zu diskutieren. Durch ihr hohes persönliches Engagement begeisterte sie mich für das wissenschaftliche Arbeiten und ermöglichte mir die aktive Teilnahme an Tagungen und erste Erfahrungen auf dem Gebiet des Publizierens.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau Barbara Amann, die jederzeit ihr unerschöpfliches Laborwissen und ihre jahrzehntelange Erfahrung mit mir teilte. Ohne ihre Unterstützung wäre mir das Fertigstellen dieser Arbeit sehr viel schwerer gefallen. Ihre aufmunternden Geschichten aus ihren Zugfahrten haben mich in Situationen, in welchen ich ein wenig am verzweifeln war, oft zum Lachen gebracht.

Herrn Dr. Günter Rademacher möchte ganz besonders Dank aussprechen. Durch Günter habe ich die große Chance erlangt, eine Doktorandenstelle an der Klinik für Wiederkäuer zu bekommen und an verschiedenen Seminaren teilzunehmen. Durch sein persönliches Engagement begeisterte er mich stets aufs Neueste für die Rindermedizin. Darüber hinaus ermutigte er mich, dem „Bluterteam“ mit meinen lieben Kollegen (denen ich auch herzlich danken möchte) Frau Dr. Carola Sauter-Louis, Frau Dr. Annette Friedrich und Frau Dr. Annette Carlin (Netti), beizutreten. Gemeinsam kämpften wir um die Aufklärung der Kälberkrankheit, wobei nicht selten (Lach-)Tränen, Schweiß und leider auch manchmal Blut geflossen ist.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der AG Deeg/Tierphysiologie Frau Dr. Hanna Zipplies, Herrn Dr. Florian Hofmaier, Frau Dr. Roxane Degroote, Frau Margarete Swadzba, Frau Kerstin Euler und Herrn Christoph Szober für die nette Arbeitsatmosphäre sowie ihre Hilfsbereitschaft und vor allem auch Frau Dr. Christina Eberhardt für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Kollegen am Institut für Tierphysiologie sowie an der Klinik für Wiederkäuer danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Ein besonderes Dankeschön gilt allen Landwirten und Tierärzten, die uns bei der Suche nach der Aufklärung für die blutenden Kälber tatkräftig zur Seite standen.

Bei meiner besten Freundin Sarah möchte ich mich für ihre Unterstützung in meiner Dissertation, meiner Arbeit und meinem Sport bedanken. Selbst die größten Entfernungen konnten uns nicht voneinander trennen. Vielen Dank für unsere gemeinsame Zeit.

Bei John bedanke ich mich besonders für den Rückhalt, die Unterstützung und sein Verständnis während der Dissertation.

Zu guter Letzt danke ich ganz herzlich meiner Familie für die Unterstützung und den Rückhalt in jeder Lebenslage und für die Möglichkeit eines sorgenfreien Studiums und der anschließenden Promotion.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name	Aryan Assad
Staatsangehörigkeit	Französisch
Geburtsdatum / -ort	08.08.1984/ Bonn

Schulbildung

1990-1994	Elsa- Brandström Grundschule
1994-2002	Helmholtz- Gymnasium
2002- 2003	Erzbischöfliches St. Joseph Gymnasium
06/2003	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

10/2003 – 02/2009	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
09/2004	Vorphysikum
09/2005	Physikum
03/2007	I. Staatsexamen
04/2008	II. Staatsexamen
02/2009	III. Staatsexamen
19.02.2009	Tierärztliche Approbation

Promotion

04/2009 – 12/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Wiederkäuer des Zentrums für klinische Tiermedizin der LMU München
-------------------	--